

**A LESÃO DE ISQUÉMIA / REPERFUSÃO EM  
TRANSPLANTE HEPÁTICO : ANÁLISE GENÉTICA,  
MORFOLÓGICA E CORRELAÇÃO CLÍNICA**

**JORGE ALBERTO CAETANO PAULINO PEREIRA**

**Orientador: Prof. Doutor José Fragata, professor catedrático**

**Co-orientador: Prof. Doutor Fernando Nolasco, professor catedrático**

**Tese para obtenção do grau de Doutor em Medicina na Especialidade em Cirurgia**

**Julho, 2014**





Tese elaborada de acordo com o regulamento  
nº 441/2011 da Faculdade de Ciências Médicas  
da Universidade Nova de Lisboa



**Este trabalho é dedicado:**

À memória do Zézé, que o sonhou

À minha Mãe e à Graça, que o viveram



# Índice

<b>PREFÁCIO .....</b>	<b>3</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>5</b>
<b>2. OBJECTIVOS.....</b>	<b>57</b>
2.1. Objectivos gerais .....	57
2.2. Objectivos específicos.....	58
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>61</b>
3.1. Introdução .....	61
3.2. Início do estudo.....	61
3.3. O Transplante Hepático .....	62
3.4. Parte experimental.....	66
3.4.1. Selecção da amostra.....	66
3.4.2. Expressão genética .....	71
3.4.3. Anatomia Patológica .....	73
3.4.4. Microscopia Electrónica.....	75
3.5. Parte clínica.....	76
3.5.1. Dadores.....	76
3.5.2. Receptores.....	78
3.5.3. Transplante Hepático .....	78
3.5.4. Dados clínicos e laboratoriais do seguimento do receptor.....	79
3.5.5. Variáveis resposta pós transplante hepático .....	83
3.6. Análise estatística .....	84
<b>4. RESULTADOS EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>87</b>
4.1. Resultados gerais .....	87
4.2. Resultados anatomopatológicos .....	89
4.3. Resultados de expressão genética.....	91
4.4. Resultados da análise comparativa entre expressão genética e histologia .....	93
4.5. Resultados da microscopia Electrónica.....	94
ANEXO 1 - Expressão genética por grupo e por pontuação histológica .....	97
ANEXO 2 - Artigo publicado em Transplantation Proceedings.....	99
<b>5. RESULTADOS CLÍNICOS.....</b>	<b>107</b>
5.1. Resultados clínicos gerais .....	107
5.1.1. Resultados precoces – Primeiros 7 dias de pós operatório.....	107
5.1.2. Complicações pós operatórias.....	108
5.1.3. Correlação entre os critérios de disfunção precoce do enxerto e as complicações .....	109
5.2. Resultados clínicos relacionados com as variáveis resposta .....	110
5.2.1. Disfunção do enxerto.....	110
5.2.2. Complicações (Dindo – Clavien) .....	112
5.2.3. Número de reinternamentos igual ou superior a dois.....	112
5.2.4. Tempo decorrido até à morte do receptor ou rejeição crónica do enxerto.....	113
5.3. Resultados laboratoriais relacionados com as variáveis resposta .....	117
5.3.1. Disfunção do enxerto.....	117
5.3.2. Complicações (Dindo – Clavien) .....	119
5.3.3. Número de reinternamentos igual ou superior a dois.....	119
5.3.4. Tempo decorrido até à morte do receptor ou rejeição crónica do enxerto.....	119
ANEXO 3 - Tabelas de análises para as variáveis resposta .....	123
ANEXO 4 - Artigo submetido para publicação em Transplantation Proceedings.....	139

<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>141</b>
6.1. Doentes.....	141
6.2. Histologia .....	148
6.3. Microscopia electrónica.....	151
6.4. Expressão genética .....	152
6.5. Análise comparativa entre expressão genética e histologia .....	166
6.6. Resultados clínicos gerais.....	171
6.7. Resultados relacionados com a variável resposta disfunção do enxerto	173
6.7.1. Resultados clínicos .....	173
6.7.2. Resultados laboratoriais .....	177
6.8. Resultados relacionados com a variável resposta complicações .....	180
6.9. Resultados relacionados com a variável resposta número de reinternamentos igual ou superior a dois .....	181
6.10. Resultados relacionados com a variável resposta tempo decorrido até à morte do receptor ou rejeição crónica do enxerto .....	182
<b>7. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>195</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>205</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>209</b>
<b>Agradecimentos .....</b>	<b>213</b>

## PREFÁCIO

Quando há já alguns anos me iniciei como cirurgião em Transplantação Hepática, estava ainda longe de apreciar como aquele procedimento constitui uma oportunidade de transformar uma catástrofe, pela perda súbita duma vida, num gesto de esperança, prolongando e transformando uma outra.

Também não sabia que, como poucas áreas médicas, a Transplantação Hepática é, ao mesmo tempo, fascinante e extenuante, compensadora e frustrante, rotineira e inovadora. Só quem a vive no dia a dia se apercebe da fadiga, e por vezes quase exaustão, das longas sessões de trabalho, mas também da expectativa ansiosa e frustração das também longas esperas sem fim, quando um enxerto teima em não aparecer para um receptor.

Desconhecia, então, o que se sente quando o esforço colectivo levado ao limite das nossas capacidades não é suficiente para alcançar o sucesso. Mas também nunca tinha sentido a recompensa de ter contribuído para um êxito alcançado à custa desse mesmo esforço.

É um desafio constante, que não permite hesitações, obrigando a uma reflexão que conduza à decisão mais correcta, na altura certa. Mas é também uma rotina de escolha, na procura dos doentes que mais possam beneficiar dum bem tão escasso, que, infelizmente, nunca estará disponível para todos os que dele precisam.

Este capítulo médico constitui uma plataforma abrangente, que engloba múltiplas especialidades, obrigando a um conhecimento profundo em várias áreas e à prática da Medicina Multidisciplinar, ao mais alto nível. Das temáticas clínicas às das ciências básicas, existe um relacionamento entre as mais variáveis áreas, com implicações recíprocas. Só assim se compreende que muita da literatura sobre o assunto que é

abordado nesta tese fosse escrita por cirurgiões, que mantêm a sua actividade como tal.

Quando decidi aventurar-me num tema fora da minha actividade clínica tive a noção da responsabilidade ao tentar manter uma ligação com áreas tão inovadoras como a Biologia Molecular e também das dificuldades na aprendizagem de novas e importantes linguagens. O estudo destas, para mim, novas matérias, foi um desafio que abracei com gosto, tentando manter-me nos objectivos pretendidos, sem uma fácil dispersão na complexidade da verdadeira explosão dos conhecimentos que se tem verificado nos últimos anos.

A terminar o meu pequeno contributo para uma melhor compreensão dos resultados clínicos correlacionados com os dados experimentais obtidos reconheço, perante o crescente volume e complexidade das inovações na área deste trabalho, como se adequam as palavras de Charles Darwin:

“ A ignorância gera confiança com mais frequência do que o conhecimento”.

Lisboa, Julho de 2014



## 1. INTRODUÇÃO

A transplantação hepática foi declarada uma terapêutica válida para o tratamento da falência hepática terminal e tumores primitivos do fígado sem nenhuma alternativa terapêutica, desde 1983 (Declaração de Bethesda, National Institutes of Health Consensus, Development Conference Statement, June 20-23, 1983) através de reconhecimento público da comunidade científica, 20 anos após a publicação referente ao primeiro transplante hepático em humanos, por Thomas Starzl, em Denver, 1963 (1).

Desde os primórdios deste procedimento, têm sido ultrapassados muitos obstáculos, técnicos e logísticos, mas principalmente o controle da rejeição, com os progressivos desenvolvimentos na imunossupressão, o que constituiu um verdadeiro incentivo à sua divulgação a nível mundial, sendo a introdução da ciclosporina na prática clínica considerada um marco histórico na história da transplantação (2).

Este facto decisivo, contribuiu para um aumento progressivo do número de transplantes hepáticos nos E.U.A. e na Europa, bem como para uma proliferação, mais tarde, de centros em quase todos os países, levando a revisões dos critérios de qualidade relacionados com os respectivos resultados (3).

Com naturalidade, a comunidade transplantadora foi-se confrontando com um enorme aumento de doentes em lista de espera, assim como das próprias indicações para o transplante, fruto dos cada vez melhores resultados progressivamente obtidos.

A discrepância entre o número de novos doentes em lista de espera e o número de transplantes hepáticos efectuados ano após ano, foi-se acentuando em todos os países, evidenciando uma realidade universal: o número de enxertos disponíveis está sempre longe do número necessário (4).

Assim, foram-se alargando, racionalmente, os critérios de colheita de fígados de cadáver, reformulando as condições para a doação, atenuando restrições clínicas e analíticas, ignorando regras de exclusão relativa, ou, pelo menos, moldando-as caso a caso, tais como a idade e serologia do dador, características histológicas, dias de internamento em unidade de cuidados intensivos e de morte cerebral, entre outras.

Definem-se mais facilmente os critérios em situações de urgência como a falência hepática aguda (5, 6) ou em casos de complicações da própria cirurgia de transplante (7). Mais difícil de definir são as situações electivas, em que vários factores surgem como determinantes, frequentemente pouco consensuais. Em paralelo, foram-se desenvolvendo técnicas de dador vivo, para os quais contribuíram decisivamente, a experiência e os progressos sucessivos em cirurgia hepatobiliar (8).

Também nesta temática de alargamento do número de dadores, foi introduzido o conceito pioneiro de transplante sequencial ou em dominó, através do aproveitamento de fígados de doentes com para-amiloidose familiar (PAF), provenientes de doentes receptores de fígado cadavérico e com aquela indicação. Assim, com um só enxerto de cadáver disponível, pode-se efectuar um segundo transplante, em que o receptor recebe o fígado explantado dum doente com PAF, no qual a estrutura hepática está intacta, comportando-se biologicamente numa forma mais favorável em virtude da ausência das consequências da morte cerebral e de tempos de isquémia mais encurtados (9).

Na prática clínica habitual, factores pré definidos determinam essa escolha, tanto do lado do dador como do receptor: idade, diagnóstico, peso, serologias, características macroscópicas e histológicas do enxerto, grupo sanguíneo, causa de morte do dador ou diagnóstico do receptor, entre muitos outros.

A escolha de determinado enxerto para determinado receptor – alocação – torna-se um dos pontos fundamentais para definir o sucesso de todo o procedimento. Multiplicam-se os critérios de gravidade do receptor numa tentativa cada vez mais rigorosa de definição das prioridades relativamente à posição em lista de espera, sendo o mais usual o MELD (Model for End-Stage Liver Disease), primeiro introduzido como modelo para calcular a sobrevida cirúrgica aos três meses dos

doentes submetidos a “shunts” jugulares portosistémicos intrahepáticos, em língua inglesa TIPS (10), posteriormente adoptado para calcular o prognóstico e definir a prioridade de transplante hepático dos doentes hepáticos crónicos (11); no entanto, muito há a definir quando se decide em relação à alocação.

Com base no MELD, elaboraram-se sistemas de classificação e alocação definindo critérios específicos com capacidade prognóstica acrescida para situações clínicas particulares, como em transplante pediátrico (12), em doentes com ascite e hiponatremia (MELD – sódio ou MELD – Na (13), integrando a idade do receptor (iMELD) (14) ou em populações específicas como no Reino Unido (UKELD) (15).

### **Sobre os sistemas de classificação e alocação**

Em transplantação hepática, o resultado final é sempre definido por uma sobreposição de factores inerentes ao processo da doação e doutros relativos ao receptor.

Esta dualidade adquire um peso relativo, que varia consoante a situação clínica considerada, e tem estado na génese das muitas classificações de risco, em vigor nos protocolos actuais:

**MELD** (Model for end-stage liver disease) – Inicialmente designado como uma classificação prognóstica, adaptada à transplantação com base num estudo publicado em 2003 (16) que demonstrou a sua acção predictiva relativamente à mortalidade aos 3 meses dos doentes em lista de espera para transplante hepático, foi progressivamente adoptado como o maior instrumento na alocação da maioria dos programas, como no CHBPT-HCC. Progressivamente, assistiu-se, nalguns países, a uma diminuição da mortalidade em lista de espera, à custa de um aumento da pontuação média do MELD dos receptores, com uma diminuição das taxas de sobrevida pós transplante (17), contrariamente ao sucedido nos Estados Unidos (18). Sendo , no seu conceito, uma classificação predictiva e não pensada para alocação, o MELD exclui factores prognósticos importantes do receptor, como o nível de sódio e a função renal, para além dos factores do dador (19).

**D-MELD** – A adopção generalizada da classificação MELD como base na alocação dos enxertos hepáticos, associada ao aumento da utilização de órgãos provenientes de dadores com critérios expandidos, levou a outras classificações que deveriam ser usadas com vista à diminuição do risco de mortalidade da combinação dador/receptor. Múltiplos factores de risco do dador e do receptor foram identificados em várias classificações, mas os adeptos desta nova, proposta em 2008, sugerem que a idade do dador seja considerada o factor de risco preponderante, por ter sido sucessivamente demonstrado na literatura (20, 21). Assim, os argumentos da simplicidade de aplicação do D-MELD, da possibilidade de se aplicar em qualquer contexto, mesmo na alocação a nível nacional, e das suas características de alta previsibilidade, são factores invocados para a sua adopção, apesar de excluir outros factores muito importantes, referentes ao dador (22).

**Índice de Risco do Dador** (“Donor Risk Index”) – Baseada na necessidade de maior previsão das consequências das variadas combinações possíveis entre características do receptor e do dador, esta classificação foi introduzida em 2006 por Feng e col. (23) . Através da revisão dos dados nacionais dos E.U.A. de 1998 a 2002, foi elaborado um modelo que identificou sete características do dador consideradas factores de risco independente para falência do enxerto: idade > 40 (sobretudo > 60) anos, doação em assistolia (DCD), partição do enxerto, raça afroamericana, estatura baixa, acidente cerebrovascular como causa de morte e outra causa de morte excluindo trauma ou anóxia. De fora desta classificação ficaram factores tão importantes como a natrémia do dador (referida como sem significado estatístico) e a percentagem de macroesteatose. Esta última característica não foi incluída, segundo Feng, devido às limitações da própria técnica de processamento dos cortes de congelação e pela ausência desta informação na maioria dos casos.

**Índice de Sobrevida Pós Transplante Hepático - SOFT** – (“Survival Outcomes Following Liver Transplantation”) – Esta classificação foi formulada com o objectivo de equiparar a previsão de mortalidade aos 3 meses em lista para transplante (MELD) com a mesma previsão relativamente ao pós transplante (24). A sobrevida pós transplante tem de ser superior à sobrevida em lista de espera, para o justificar. Através da análise univariada e multivariada em mais de 20.000 receptores de

fígado, foram identificados 12 factores do receptor (relativos a idade, índice de massa corporal, retransplante, cirurgias prévias, albumina, internamento em UCI, MELD, ventilação, encefalopatia, trombose portal, hemorragia por hipertensão portal e ascite), 4 factores do dador (idade, causa de morte, tipo de alocação regional ou nacional e tempo de isquémia fria) e 2 factores operatórios (períodos de isquémia quente e isquémia fria). Por um sistema de pontuação, positiva ou negativa, obtém-se um valor predictivo da sobrevida do receptor e do enxerto a três meses pós transplante. Esse valor permite catalogar o transplante segundo o risco progressivo, como referido no capítulo de materiais e métodos: risco baixo, baixo-moderado, alto-moderado, alto e fútil.

**Balanço de Risco (BAR)** - O mais recente dos modelos de alocação, foi introduzido em 2011 por Dutkowski e col. (25). Baseado em factores do receptor e do dador, teve por objectivo simplificar o sistema de pontuação e permitir a sua utilização generalizada às várias populações com as suas características diferentes. A comparação da pontuação obtida, com outras características do enxerto não incluídas, como a esteatose, permite, nesta classificação, assumir com maior segurança a utilização de enxertos provenientes de dadores com critérios expandidos. Utilizando a base de dados da UNOS (United Network for Organ Sharing) foi feita uma análise de risco nos mais de 27.000 receptores adultos de enxertos hepáticos cadavéricos entre 2002 e 2010 nos E.U.A.. Esta análise foi posteriormente validada numa base de dados europeia, com 233 receptores nas mesmas circunstâncias. Definiram-se seis variáveis como as mais importantes na previsão da sobrevivência ao transplante: a pontuação MELD do receptor, o tempo de isquémia fria, a idade do receptor e do dador, o factor retransplante e a necessidade de suporte avançado de vida no momento do transplante (25).

Entre as classificações apresentadas, no que respeita ao risco do transplante e respectiva alocação, as que envolvem factores tanto do receptor como do dador (SOFT, D-MELD e BAR) têm uma maior previsibilidade, relativamente às que incluem apenas factores do dador (DRI) ou do receptor (MELD). Além desta característica, duas classificações foram validadas também em bases de dados europeias, alargando a sua utilização a vários tipos de população com características próprias:

D-MELD e BAR (26).

A classificação de Balanço de Risco (BAR) tem a vantagem de incluir poucas variáveis facilmente obtidas em qualquer situação, e de estabelecer uma complementaridade com outros factores fundamentais em transplantação hepática mas excluídas de todas as classificações, como a esteatose. Permite, pela pontuação obtida, maior objectividade e segurança na utilização de enxertos provenientes de dadores com critérios expandidos, com maior margem de aproveitamento (27).

Uma das limitações da alocação baseada exclusivamente na pontuação do MELD é a indefinição na prioridade do acesso ao transplante em casos de patologias sem óbvia deterioração da função hepática, com mau prognóstico no curto prazo sem o transplante mas com excelente benefício se o fizerem (28). Estes casos são definidos como excepções à pontuação MELD, e incluem vários tipos de patologias, nomeadamente o carcinoma hepatocelular: a frequência desta indicação levou mesmo à reformulação de critérios específicos, com pontuações e prioridades particularizadas (29).

Entre outras indicações para transplante como excepção ao MELD refira-se, pela sua relevância em Portugal, a PAF, cujo acesso prioritário foi definido nalguns modelos, como no caso francês desde 2007, com um novo sistema de alocação (F.L.A.S. – French Liver Allocation Score, Agence de la Biomédecine <https://www.sipg.sante.fr>).

O número de enxertos denominados primeiramente sub-óptimos, designação substituída após a definição de critérios expandidos, foi aumentando, viabilizando maiores possibilidades de transplante em variadas situações clínicas (30).

Para além destas características clássicas que a determinam, existe a convicção de que a alocação correcta não se esgota com os meios actuais, e que poderia lucrar com uma metodologia mais precisa, que medisse mais objectivamente as consequências dos insultos isquémicos do enxerto em todo o procedimento (31).

Se por um lado, o cumprimento de protocolos cirúrgicos rigorosos torna menor a frequência de situações em que o insulto isquémico sobre o enxerto se traduz em

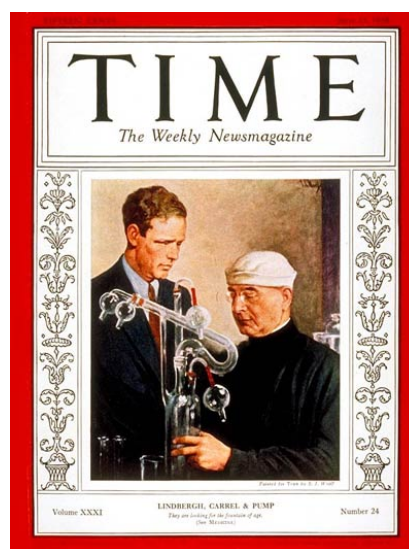
consequências clínicas, por outro, a necessidade de alargamento dos critérios de doação hepática leva à utilização de enxertos mais vulneráveis às diferentes agressões, com percursos menos bons e com custos acrescidos em morbimortalidade (32).

Uma das consequências inevitáveis do processo cirúrgico de colheita e transplantação é o insulto isquémico do enxerto, minorado pelo refinamento da técnica cirúrgica, bem como pela introdução de novos solutos de preservação e de máquinas de perfusão, estas últimas já idealizadas e testadas experimentalmente desde as primeiras décadas do século XX por Charles Lindbergh e Alexis Carrel (33) (Figuras 1 e 2).

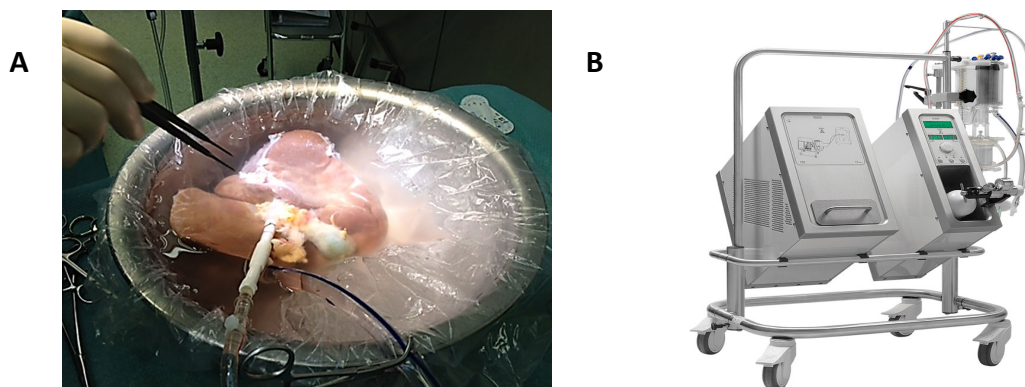
Cada vez mais eficazes na atenuação das consequências clínicas relevantes do insulto isquémico, as novas técnicas de perfusão (Figuras 3A e 3B) constituem uma linha de investigação inovadora e promissora para um futuro breve (34).



**Figura 1** - Máquinas de perfusão de órgãos dentro de uma incubadora, desenhadas por Alexis Carrel e Charles Lindbergh em 1938. Adaptado de (33) *Autorização de reprodução concedida, Harper & Bros.*



**Figura 2** - Charles Lindbergh e Alexis Carrel, na primeira página da Time (13 de Junho de 1938) *Autorização de reprodução concedida, Time Newsmagazine*



**Figura 3 A e B** - Sistema de perfusão hepática hipotérmica oxigenada.

Adaptado de HOPE – Hypothermic Oxygenated Machine Perfusion (Organ Assist Perfusion Systems, Groningen, The Netherlands: [www.organ-assist.nl](http://www.organ-assist.nl))

Autorização de reprodução concedida (Prof. Dutkowski, Organ Assist)

### **Lesão de isquemia/reperfusão: Estado da arte**

O transplante hepático ortotópico é uma terapêutica reconhecidamente aceita para casos seleccionados de falência hepática terminal. O procedimento tem-se aperfeiçoado durante as últimas décadas, evidenciado pelo aumento da taxa de sobrevida de 30 para 75% aos 5 anos – U.N.O.S. (35). Cerca de 13 a 27% dos enxertos desenvolve falência primária (PNF) ou disfunção primária (DF) após o transplante, com consequências devastadoras para a sobrevida do doente e do enxerto (36). A sua etiologia é multifactorial, incluindo factores relacionados com o dador e o receptor, tempos de isquemia, agressões cirúrgicas, bem como características anatomopatológicas do enxerto (37). Apesar destes factores, existe uma relação íntima entre a PNF e a DF, a preservação do enxerto, a lesão de isquemia / reperfusão, e a falência do transplante. Além disso, está comprovada evidência que sugere que a lesão de I/R torna um aloenxerto mais vulnerável por aumento da imunogenicidade, aumentando a probabilidade de episódios de rejeição precoce e tardia (38).

A interrupção do fluxo sanguíneo para o fígado é um fenómeno comum durante a cirurgia hepática de ressecção, e inevitável em transplantação. Essa ausência de



fluxo e de fornecimento de nutrientes conduz a dano celular através de diversos mecanismos, que por sua vez se podem exacerbar na fase de revascularização do órgão. Este tipo de alterações é já sobejamente conhecido e apresenta diversas designações: síndrome de isquémia/reperfusão, síndrome de pós reperfusão e que será aqui descrito como lesão de isquémia/reperfusão (LIR).

A lesão de isquémia/reperfusão, apesar dos grandes progressos na abordagem perioperatória do receptor dum enxerto hepático, mantém-se não só como um factor de risco intra operatório, mas também com implicações directas sobre toda a evolução do transplante.

O objectivo da preservação é reduzir o metabolismo celular, atrasando/evitando a lesão do órgão. Quando a perfusão é feita através duma solução fria, o metabolismo celular é reduzido mas a eficácia na produção de energia também o é (39). A concomitante depleção de ATP celular na fase de hipóxia, conduz a uma sucessão de eventos moleculares, responsáveis pela produção de produtos tóxicos da degradação de oxigénio, “Reactive Oxygen Species” (ROS), que actuam na fase de reperfusão (40).

ROS são produtos intermédios de muitas reacções fisiológicas, nomeadamente a génese de ATP mitocondrial, degradação proteica e lipídica, e respostas inflamatórias. Em circunstâncias normais, as defesas antioxidativas conseguem antagonizar os radicais livres, evitando o stress oxidativo. Este último condiciona a lesão celular por peroxidação lipídica do ADN, desnaturação enzimática e activação de sinalização intracelular para morte celular programada (apoptose) (41).

Porém, no contexto de agressão hepática por I/R, a síntese de ROS pode exceder a capacidade dos sistemas de degradação redox, iniciando os eventos de lesão hepatocelular, necrose, apoptose e consequente inflamação (42).

Todos os tipos de células hepáticas podem sintetizar ROS, mas utilizam para esse objectivo diferentes mecanismos e compartimentos celulares também diferentes: as células de Kupffer e as células endoteliais produzem ROS vascular por acção da

NADPH oxidase da membrana celular; os hepatócitos segregam ROS intracelular através das mitocôndrias pela xantina oxidase (43).

A lesão inflamatória originada pela I/R resulta na activação das células da imunidade, como as células de Kupffer e os linfócitos T, devido ao aumento de ROS, segregando potentes citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e outras), assim como quimiocinas (MIP-2, MCP-1), moléculas de adesão e de recrutamento doutras células imunocompetentes, tais como neutrófilos, levando a infiltração celular do fígado lesado. Estes processos inflamatórios potenciam a produção de ainda mais ROS, induzindo apoptose e amplificando a lesão do enxerto (44).

A interpretação dos fenómenos da LIR foi evoluindo, nas últimas duas décadas, dum modelo puramente patobioquímico para um modelo com duas fases interrelacionadas, de insulto isquémico e resposta do sistema imunitário inato, na reperfusão: avanços recentes no conhecimento desta lesão têm demonstrado um papel fundamental dos linfócitos T, em particular dos CD4+, na activação e na regulação da resposta inflamatória imunitária (45).

Apesar da natureza da resposta imunológica da LIR ser, essencialmente, inata, os linfócitos T, particularmente os CD4 e as suas subpopulações, são mediadores celulares fundamentais (46), demonstrando uma interrelação entre os sistemas inato e adaptativo (47).

A caracterização clínica da LIR foi pela primeira vez reconhecida e caracterizada por Aggarwal e colaboradores (48), consistindo num quadro de alterações cardiovasculares severas, com diminuição da pressão arterial média em mais de 30% da registada na fase anhepática, mantida por mais de um minuto e nos primeiros 5 minutos após a reperfusão, diminuição das resistências vasculares sistémicas, aumento da pressão da artéria pulmonar e da pressão de encravamento do ventrículo esquerdo. Estas alterações podem corresponder a disfunção cardíaca aguda, mas também recorda de perto o síndrome de resposta inflamatória sistémica (SRIS). Outros eventos associados e descritos são a bradicardia e asistolia, e a fibrinólise com necessidade de correcção terapêutica. A incidência desta síndrome é de cerca de 30% (2-4), e é atenuada nas situações em que se opta pela técnica de

“Piggy back” (49, 50), contribuindo para a manutenção do fluxo sanguíneo na veia cava inferior através duma clampagem lateral e parcial (51).

No Quadro 1 são apresentados alguns estudos clínicos que caracterizam esta situação. De notar que alguns aspectos não estão cabalmente esclarecidos, particularmente as definições, baseadas muito nas alterações da pressão arterial média, em que o valor basal é o registado na fase anhepática do transplante, facto que pode levar a indefinições, dadas as flutuações hemodinâmicas multifactoriais registadas nesse momento. Para além disso, o uso de vasopressores (como o azul de metileno) nos momentos que antecedem a desclampagem portal, pode atenuar os efeitos habitualmente registados na pós reperfusão, alterando a percentagem desses valores comparados da pressão arterial (52).

Notavelmente, o estudo de Hilmi e colaboradores (53) observou alterações em todos os doentes estudados, embora só em 55% dos casos fossem consideradas severas.

Inicialmente as causas desta síndrome foram atribuídas a acidose metabólica, hipercalcémia, hipotermia e à libertação de substâncias vasoactivas do enxerto (53). Contudo, os eventos são mais complexos: em certas circunstâncias, pode haver uma ausência completa de instabilidade hemodinâmica mesmo na presença de uma grave disfunção do enxerto, devido a um fluxo portal inadequado (54).

Assim, torna-se essencial determinar a relação entre a síndrome pós reperfusão e a qualidade do enxerto, sendo esta última a sua causa ou a sua consequência? (54).

A lesão de isquémia / reperfusão é complexa e longa, e só se inicia na clampagem dos vasos aferentes do fígado – aorta, nos dadores cadáver, ou veia porta e artéria hepática, nos dadores vivos: no entanto, é condicionada previamente, pelo estado hemodinâmico e pela inerente manipulação do fígado.

Para se entender a complexidade dos fenómenos envolvidos é necessário considerar que as alterações verificadas na LIR são também consequência das alterações verificadas no dador. Os processos de agressão sobre o enxerto hepático começam com as consequências sistémicas da morte cerebral, que se declaram antes do seu diagnóstico clínico (no caso de enxertos de cadáver).

A grande maioria dos enxertos hepáticos é proveniente de doadores em morte cerebral, cujas circunstâncias influenciam decisivamente os desempenhos respectivos, tanto no curto como no longo prazo (55): toda a lesão cerebral significativa causa uma reacção sistémica, independentemente da sua etiologia, gerando um ambiente pró-inflamatório com efeitos hormonais e consequências hemodinâmicas que se repercutem em órgãos à distância, e que antecede a morte cerebral (56).

Na abordagem do dador, há que ter em conta múltiplos factores relacionados com o tempo de permanência do dador nas unidades de cuidados intensivos, como a presença de infecções e a desnutrição: a disponibilidade de substratos da glicólise, com menor depleção de glicogénio durante o período de isquemia, mantém níveis de ATP hepáticos, atenuando o efeito deletério da reperfusão. A desnutrição também causa alterações nas defesas antioxidantes dos tecidos através de alterações mitocondriais (57).

O estudo dos fenómenos envolvidos no processo de morte cerebral e das lesões que a antecedem, levou ao seu reconhecimento e primeira definição em 1968, na Escola Médica de Harvard, E.U.A., em resposta ao incremento dos procedimentos da Medicina Intensiva e da Transplantação (58). O interesse sobre esta matéria aumentou a partir da década de 90, devido a constatações clínicas em transplantação renal, que demonstraram diferenças substanciais no melhor desempenho dos aloenxertos provenientes de doadores vivos relacionados, quando comparados com os cadavéricos (59). Posteriormente, Terasaki e col. demonstraram que essa evidência também se aplica aos enxertos renais provenientes de doadores vivos não relacionados, em que as disparidades imunológicas são semelhantes às encontradas nos enxertos cadavéricos (60). Também em transplantação hepática clínica se demonstrou a superioridade dos enxertos não sujeitos às acções da morte cerebral, constatação descrita primeiramente em transplante pediátrico de dador vivo (61).

Reconhecendo-se a importância de aumentar os conhecimentos dos fenómenos sistémicos associados à morte cerebral, intensificou-se, desde os anos 90, a

investigação básica em modelo animal, divididos em duas categorias: animais pequenos (modelo em roedores) e animais grandes (sobretudo modelos porcos e caninos). Evidenciaram-se, no entanto, discrepâncias nos resultados obtidos nestas duas classes: uma das observações mais importantes foi a ausência de resposta inflamatória quando se prevenia a hipotensão através de ressuscitação por fluidoterapia agressiva, em modelos de animais grandes, tanto no fígado (62, 63) como no rim (64). Assim, poder-se-á questionar se a inflamação demonstrada nos enxertos cadavéricos é devida ao estado de morte cerebral em si mesmo, obrigando a nova reflexão quando se tentam extrapolar estes resultados e respectivas interpretações para o cenário humano (65).

Na vertente clínica, o reconhecimento da importância da terapêutica precoce e agressiva dos dadores em morte cerebral, levou ao estabelecimento de protocolos de ressuscitação hemodinâmica e hormonal a partir da década de 90: o programa pioneiro do Hospital Papworth (Reino Unido) tornou possível converter 84% dos dadores multiorgânicos sem critérios para doação na avaliação inicial para parâmetros aceitáveis para transplante (66).

A lesão sobre o Sistema Nervoso Central (SNC) associa-se ao SRIS, antes do estabelecimento da morte cerebral, podendo verificar-se com a barreira hematoencefálica intacta: está associado à mobilização leucocitária no fígado, à libertação de mediadores pró-inflamatórios, à produção de ROS nos órgãos periféricos e aumento da permeabilidade vascular, conduzindo à disfunção hepática (67). Independentemente da etiologia da lesão do SNC, a libertação sistémica de citocinas antecede a morte cerebral (68).

Nas situações em que se verifica uma disrupção da barreira hematoencefálica, é permitido o acesso bidirecional das células e dos mediadores pró-inflamatórios, induzindo inflamação local e condicionando os órgãos alvo para futuras agressões progressivas (69).

A morte cerebral estabelece-se a partir do momento em que há lesão irreversível do tronco cerebral, associada a lesão dos hemisférios cerebrais, com coma irreversível, ausência dos reflexos do tronco cerebral e abolição da respiração espontânea (70).

A partir deste momento, desencadeia-se um estado inflamatório sistémico, com citoquinémia maciça com grave desregulação do sistema nervoso autónomo, habitualmente designado tempestade autonómica (“autonomic storm”), gerando-se uma complexa teia de desequilíbrios interrelacionados: imunológico, coagulopático, hemodinâmico e endócrino (71). A falência do tronco cerebral, quando resultante da hipertensão intracraniana, segue uma progressão craniocaudal, iniciando-se por hipertensão e bradicardia (reflexo de Cushing, (72)).

Segue-se uma descarga maciça de catecolaminas, devido a uma descarga do SN Simpático, sem antagonismo por isquémia do núcleo vagal parassimpático, numa tentativa de compensação da hipoperfusão cerebral (73). Nesta fase, assiste-se à formação de microtrombos e vasoconstrição periférica, diminuindo a perfusão dos órgãos e tecidos (74). Com a progressão inferior da isquémia do tronco cerebral, os núcleos simpáticos necrosam, levando a uma diminuição do estímulo simpático miocárdico e vascular, com consequente hipotensão (75).

Um acréscimo na hipoperfusão dos órgãos periféricos é ainda devido a desequilíbrios hormonais induzidos pelas variações acima descritas, com diminuição dos níveis circulantes de tiroxina, insulina, cortisol, e instalação de diabetes insípida (76). A perda da função termorreguladora leva a poiquilotermia e a hipotermia progressiva, com implicações na função cardíaca e no metabolismo celular (77).

Embora não fossem detectadas diferenças na infiltração por neutrófilos nos enxertos hepáticos provenientes de dadores cadavéricos quando comparados com os de dador vivo, constatou-se maior infiltração mas apenas nos enxertos cadavéricos provenientes de dadores infectados (78).

Os efeitos prejudiciais da morte cerebral e fenómenos associados potenciam-se com a isquémia fria, resultando numa menor resistência à agressão após a reperfusão do enxerto, com diminuição da sua sobrevida média (79).

Em estudos clínicos, a utilização de corticóides (metilprednisolona) nos dadores de fígado demonstrou uma redução dos níveis de mRNA intracelular dentro do enxerto de moléculas de adesão e Fas ligando, com redução da LIR e da incidência de

episódios de rejeição aguda (80): a utilização deste fármaco integra o protocolo habitual das colheitas multiorgânicas do Centro de Colheita do Centro Hospitalar de Lisboa Central.

Para além das alterações fisiológicas e hemodinâmicas, a morte cerebral induz, simultaneamente, alterações imunológicas (81), que contribuem, alternadamente, para supra e infra regulações de citocinas pró e anti inflamatórias (82), com aumento dos níveis séricos de TNF alfa, IL-8, IL-10 e IL-6, esta última correlacionada com a gravidade da lesão do SNC (83). Foi demonstrado, em modelo animal de morte cerebral, que a supressão da tempestade autonómica, por anestesia epidural torácica, não antagonizou o efeito inflamatório sistémico, demonstrando vias diferentes na lesão dos órgãos periféricos (84).

Segue-se o período de manutenção hemodinâmica do dador, que se prolonga de acordo com os protocolos de cada Unidade de Cuidados Intensivos.

O início da operação de colheita já suporta as consequências da morte cerebral e do início da agressão cirúrgica. A partir do início da lesão de isquémia / reperfusão (clampagem dos vasos), dá início uma sucessão de fenómenos moleculares, que se prolongam por vários dias, mas que, no presente estudo, só se documentam, em termos de expressão genética, até cerca de 60 minutos depois da reperfusão arterial (tempo da biópsia T2).

Os grupos celulares envolvidos no processo das agressões incluem:

- **Hepatocitos** – É de longe o grupo celular mais populoso no fígado, com uma média de  $80 \times 10^9$  em todo o órgão (60% da sua população celular e 80% do seu volume total (85)), estando entre as maiores células do organismo (20-30  $\mu\text{m}$ ) e as que têm maior longevidade (86). Os hepatocitos são responsáveis pela síntese de proteínas de fase aguda, acção que é mediada por citocinas (IL-6, IL-1, TNF $\alpha$  e interferon gama (IFN- $\gamma$ ) produzidas por células inflamatórias nos locais de lesão. Destas citocinas, a IL-6 parece ser o principal mediador inflamatório (87). Estes mediadores de fase aguda também influenciam a expressão genética de proteínas intra hepatocitárias constituintes do seu mecanismo de defesa, como a HO-1 (88).

Os hepatocitos constituem unidades funcionais desde o espaço porta à veia centrolobular, e, apesar de manterem semelhança histológica, são funcionalmente distintos em 3 zonas características consoante a sua localização, conceito designado por zonação (89). Este conceito tem implicações directas na capacidade relativa de resistência às agressões de todo o processo de colheita / transplante, consoante a localização do hepatocito, sendo sempre mais sensíveis os da zona 3, pericentrolobular, pela diminuição do conteúdo de glicogénio (90).

Este grupo celular hepático é o que demonstra maior sensibilidade à isquémia quente, estando demonstrado um limiar de viabilidade de 103 minutos em animal de experiência (91).

- **Células endoteliais sinusoidais** – Constitui a população celular que forma os sinusóides hepáticos, que, ao contrário doutros órgãos, formam múltiplas fenestras e são desprovidos de membrana basal (92). Estão separadas dos hepatocitos subjacentes pelo espaço de Disse, e são as primeiras células em contacto com o fluxo sanguíneo. À medida que o lúmen dos sinusóides se vai estreitando do espaço porta para a veia centrolobular, verifica-se uma acomodação mútua entre as suas células e as células do sangue, num processo designado de “massagem endotelial” (93), que permite trocas pelas fenestras para o espaço de Disse. As células endoteliais dos sinusóides expressam várias moléculas de adesão, que permitem recrutar leucócitos e outras células inflamatórias, em resposta a vários estímulos patogénicos. Sintetizam também óxido nítrico pela óxido nítrico sintetase (NOS), que é responsável pela regulação do tónus dos sinusóides, e, em resposta a agressões hepáticas e a estimulação por citoquinas, podem também sintetiza-lo mais rapidamente, pela expressão da sua isoforma induzida (iNOS) (94). As células endoteliais sinusoidais também têm uma função importante como células apresentadoras de antígenos, activando assim o sistema imunitário; no entanto, ao contrário das outras células com funções imunitárias semelhantes, esta sua função diminui em resposta às endotoxinas, permitindo simultaneamente uma depuração eficaz dos antígenos bacterianos sem indução de inflamação hepática. Assim, permite aos hepatocitos um funcionamento basal estável do ponto de vista imunológico (95). São o grupo celular hepático mais sensível à isquémia fria, com



alterações morfológicas importantes a partir das 8 horas (96), com alterações da sua citoarquitectura e alargamento das fenestras sinusoidais. Mas as principais alterações morfológicas são notadas após a reperfusão, com destacamento das paredes dos sinusóides, balonização e morte celular preferencialmente por apoptose (97). Estas alterações são mais marcadas junto aos espaços porta, relativamente às áreas pericentrolobulares (98), por razões ainda por esclarecer (97).

- **Células epiteliais biliares ou colangiocitos** – Constituem uma rede tridimensional de conductos que constituem a árvore biliar, que se divide entre o componente extra e intra hepático, estando a sua irrigação dependente exclusivamente da artéria hepática. Constituem apenas cerca de 3 a 5% do número total de células do fígado, mas são essenciais à formação dos componentes da bília e ao seu transporte até ao duodeno (99). A rede canalicular intrahepática começa com os colangiólitos, que é a primeira estrutura composta por colangiocitos, sendo a bília progressivamente alcalinizada e diluída pela sua acção secretora, que contribui para cerca de 40% do volume biliar humano (100). Os colangiocitos apresentam uma importante heterogeneidade funcional, consoante a sua localização relativa na árvore biliar: enquanto os dos grandes ductos participam na secreção de mucina e nas respostas aos estímulos hormonais, os dos pequenos ductos têm a capacidade de adquirirem um fenótipo reactivo ou reparador. Em condições basais mantêm-se em fase  $G_0$  do ciclo celular, mas em condições de agressão podem adquirir alterações proliferativas (101). Os colangiocitos são mais resistentes à lesão por anóxia que os hepatocitos, sucedendo o inverso na reperfusão: a síntese de ROS é cerca de 5 vezes maior nos colangiocitos (102) reagindo através de apoptose traduzida por ductopénia precoce e resposta proliferativa tardia (103).

- **Células de Kupffer** – Constituem cerca de 80-90% dos macrófagos tissulares do organismo humano e 35% das células não parenquimatosas hepáticas (104). Situam-se no lúmen dos sinusóides hepáticos, predominam nos espaços porta e são a primeira população de macrófagos do organismo em contacto com as bactérias e seus produtos (105). Quando activadas produzem várias substâncias pró inflamatórias, como citocinas, óxido nítrico e ROS,  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ , que regulam o seu próprio fenótipo, bem como o fenótipo de outros grupos celulares (hepatocitos,

células estreladas e células endoteliais) e ainda outras células imunocompetentes não residentes no fígado (106). A sua activação decorre da estimulação de receptores específicos, situados na sua membrana plasmática, e um dos principais estímulos são as endotoxinas (lipopolissacáridos – LPS) das bactérias gram-negativas intestinais (107). Uma resposta inflamatória excessiva desencadeada pelas células de Kupffer activadas é um mecanismo decisivo na LIR (108), que se inicia logo na fase de isquémia (109) e prossegue depois da fase anhepática da transplantação, derivado da acumulação de LPS (110).

- **Células estreladas ou células de Ito** – Também referidas como células perisinusoidais, designam-se simplesmente como células estreladas desde o consenso de 1996 (111). Constituem 1.5% do volume hepático total e 5 a 8% do número total de células do fígado adulto; localizam-se no espaço de Disse, adjacentes aos hepatocitos e debaixo da camada fenestrada sinusoidal das células endoteliais, com extensões do citoplasma que contêm filamentos e microtúbulos que abrangem 2 ou 3 hepatocitos (112). Contêm, no seu citoplasma perinuclear, 50 a 80% dos retinóides do organismo (113). A activação destas células constitui uma resposta primária tissular à lesão hepática de vários tipos, adquirindo um fenótipo tipo miofibroblasto, proliferativo com produção de matriz extracelular anormal, com perda progressiva de retinóides (114). As células estreladas são responsáveis pelo equilíbrio na arquitectura do fígado como um todo, pela regulação da produção de matriz extracelular, em condições fisiológicas, ou pela sua distorsão, em condições patológicas (115). São também responsáveis pela regulação em cerca de 40 a 50% da resistência vascular hepática (116), respondendo à acção da endotelina 1 através contracção dos sinusoides, com relaxamento pelo óxido nítrico (117).

- **Linfócitos associados ao fígado** – Este grupo integra um dos tipos celulares imunitários recrutadas para o fígado em condições fisiológicas, constituindo cerca de 5% das células hepáticas. É composto por células do sistema imunitário adaptativo (linfócitos B e T) e do sistema imunitário inato (células NK – “Natural Killer Cells” e células NKT – “Natural Killer T Cells”). Estes dois últimos subgrupos constituem, respectivamente, 31% e 26% do total de linfócitos hepáticos (118). Este equipamento celular torna o fígado particularmente enriquecido com um

importante sistema imunitário inato, em comparação com outros órgãos parenquimatosos (119). Os linfócitos hepáticos encontram-se dispersos no parênquima, mas predominam junto aos espaços porta, em contacto com as células de Kupffer e com as células endoteliais dos sinusoides. Contrariamente ao sangue periférico, onde predominam os linfócitos T e B com receptores específicos para antígenos (85%), os linfócitos hepáticos são maioritariamente células NK e NKT (65%) (120). Estes dois últimos tipos celulares têm importantes funções reguladoras no sistema imunitário hepático, variando a sua população consoante o estímulo inflamatório, através de subpopulações específicas (121).

Todas estas células estão envolvidas nas várias etapas do decorrer do procedimento cirúrgico da transplantação, expressando vários genes, implicados na génese ou regulação de **três** mecanismos de lesão celular – **stress oxidativo** (produção de radicais livres), **inflamação** e **apoptose**:

- **CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4)**

Receptor proteico que regula o sistema imunitário. Está presente na superfície das células T. O ataque imunitário regulado pelas células T pode ser interrompido através da estimulação do receptor CTLA-4 que funciona como um interruptor para desligar. A CTLA-4 é um membro da superfamília das imunoglobulinas e é expressada à superfície das células T Helper, e transmite um sinal inibidor às células T. A expressão de CTLA-4 reduz a proporção de células que prolifera ou que segrega citocinas, aumentando assim o limiar à resposta das células T (122).

- **INTERLEUCINA 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ )**

Citoquina proteica, também conhecida como catabolina, descrita em 1972, produzida pelas células do sistema imunitário inato, como macrófagos activados, nomeadamente as células de Kupffer, e pelos monocitos sanguíneos. É uma potente citocina pró inflamatória, processada na sua forma activa pela caspase 1 (interleucina 1 $\beta$  convertase), actua como um importante mediador inflamatório, responsável por várias actividades celulares incluindo diferenciação, proliferação e

apoptose e outra forma específica de morte celular programada denominada piroptose (123).

A sua produção intracelular é através duma forma inactiva precursora, a pró-IL1 $\beta$ , que necessita de nova estimulação através de D.A.M.P.s, (“danger associated molecular patterns”, moléculas endógenas de células mortas) e de P.A.M.P.s (“pathogen associated molecular patterns”, moléculas derivadas de microorganismos) para passar à sua forma activa, através de complexos intraintracelulares denominados inflamosomas. A sua secreção pode usar vias não clássicas, sem passar por vias intracelulares envolvendo o aparelho de Golgi /retículo endoplasmático: exocitose clássica através de lisossomas, por exosomas da membrana plasmática ou através de morte celular com grande estimulação do sistema imunitário inato, consoante a crescente magnitude do estímulo inflamatório (secreção terminal).

O seu papel no tecido hepático como uma das mais potentes citocinas inflamatórias leva a que seja considerada em quase todas as fases do processo de agressão de I / R. (124). Por ser segregada muito precocemente após a estimulação inflamatória, pode ser considerada como um potencial marcador em amostras pré transplante (125).

- **TNF- $\alpha$**

Citoquina potente próinflamatória, considerada o mediador primário de inflamação na lesão de isquémia reperusão.

A L.I.R. envolve múltiplas vias, nomeadamente pela depleção de ATP pelo consumo de glicogénio e hipóxia, gerando a expressão à superfície celular de DAMPs e PAMPs durante o período de isquémia, conduzindo as células de Kupffer à síntese de citocinas pró inflamatórias, entre as quais a TNF- $\alpha$ . É expressada por muitos tipos celulares activados residentes no fígado, como as células de Kupffer, neutrófilos, linfócitos B, linfócitos T CD4+, células NK e NTK e monocitos, entre outras.

A TNF- $\alpha$  actua nos hepatocitos, através de dois tipos de receptores, TNFR1 e TNFR2, que activam vias diferentes, que são responsáveis por apoptose ou necroptose, ou,

pelo contrário, por regeneração dos hepatocitos. Assim, é um ponto actual de investigação na área da inflamação, por ser um dos mediadores principais e por conter a dualidade, consoante a activação da via determinada: apoptose e necroptose ou regeneração hepatocitária (126).

- **INTERLEUCINA 13 (IL13)**

Citoquina anti inflamatória, produzida principalmente pelos linfocitos T helper tipo 2 (Th2). Está relacionada intimamente com a interleucina 4, considerada por vezes como redundante em relação a esta, tendo grande proximidade de localização cromossómica. É conhecida por ser reguladora de citoquinas pró inflamatórias, como a TNF- $\alpha$ , a IL-1 $\beta$ , a IL-6 . É um potente inibidor da acção inflamatória da TNF- $\alpha$  e doutras citoquinas e inibe a apoptose das células endoteliais. Regula a actividade dos macrófagos, nomeadamente, das células de Kupfer.

Inibe a produção de citoquinas pró inflamatórias (IL 1,6,8,10 e 12), e previne a apoptose em células endoteliais, através de mecanismos dependentes da acção protectora da HO-1. Estimula a produção, proliferação e diferenciação de linfocitos B. (127).

- **INTERLEUCINA 4**

Citoquina descoberta em 1982, que induz diferenciação de células T “naives” (células Th0) em células Th2, o que, por sua vez, induz produção acrescida de IL4. Tem funções semelhantes à IL 13, tendo também, propriedades anti inflamatórias. Inibindo a produção de citoquinas inflamatórias (IL1, IL6, TNF- $\alpha$ ). Produzida, também, por mastocitos (128).

- **INTERLEUCINA 6**

Citoquina inflamatória, podendo, também, ter actividade anti inflamatória (mediada pela inibição sobre a TNF- $\alpha$  e a IL1) . Pertencente a uma família de mediadores associados a resposta de fase aguda, é uma molécula importante na indução de apoptose e resposta inflamatória: regula a resposta de fase aguda e a activação das

células T. Actua, também, na maturação de linfócitos B, estimulando também a IL-1, actuando em sinergia (129).

- **PERFORINA**

Proteína citolítica , associada à função indutora de apoptose da Granzima B, utilizada pelos linfócitos citotóxicos. Está presente em grânulos dos linfócitos T citotóxicos e das células NK (natural killer cells).

Efectua a rotura da membrana celular através de um poro, dependente da presença de cálcio, facilitando o influxo da Granzima B para dentro da célula alvo, activando depois as Caspases citoplasmáticas e induzindo apoptose. Este processo pro apoptótico está dependente da perforina.

Uma outra teoria, ainda em debate, admite que a perforina em conjunto com a Granzima B são assimiladas pelas células alvo através do mecanismo de endocitose (130).

- **GRANZIMA B**

Devendo o seu nome à característica de secreção dentro de grânulos (“granule enzymes”), é uma protease de serina, libertada de grânulos citoplasmáticos pelas células NK (Natural Killer Cells) e por células T citotóxicas. Induz apoptose através dum complexo multimérico com a perforina.

Previamente suposto que a entrada nas células alvo se processava através da criação dum poro na membrana celular pela perforina, admite-se recentemente que essa acção conjunta é mediada por um receptor específico, que incorpora o complexo Perforina/Granzima B através de endosomas.

Constitui, com a Granzima A, uma das granzimas mais abundantes. Existem vários tipos de granzimas, como se fossem redundantes; no entanto, servem para abordar uma multiplicidade de tarefas para as quais são requisitadas devido à grande variedade de patogéneos que têm de eliminar.

Dentro da célula alvo, a Granzima B induz apoptose através de várias vias: induz alterações mitocondriais, com libertação de citocromo C, e induz a activação da caspase 3 e da caspase 8, podendo também induzir mecanismos independentes das caspases (131).

- **SELECTINA E (SELE)**

Molécula de adesão leucócito – endotelial, dependente do cálcio, pertencente a uma família de glicoproteínas que medeiam interações entre leucócitos e células endoteliais, de baixa afinidade, promovendo desaceleração da velocidade de circulação na corrente sanguínea, e depois a adesividade (“tethering and rolling”) dos leucócitos aos sinusoides hepáticos, através de resíduos específicos de carboidratos.

A sua expressão é sobretudo induzida pela estimulação das células endoteliais, aguda ou crónica. A expressão desta molécula pelas células endoteliais é estimulada por várias citocquinas e por produtos de activação do complemento, que levam a um recrutamento de leucócitos. Não é armazenada nas células, tendo de ser sintetizada e transportada para a superfície celular.

A sua produção é estimulada pela TNF- $\alpha$  e pela IL-1 $\beta$ , levando cerca de duas horas a ser expressada na superfície das células endoteliais.

A sua expressão máxima é às 6 a 12 horas depois da estimulação pelas citocquinas, retornando aos níveis basais após 24 horas (132)..

- **FASLIGANDO (FAS-L)**

Ligando do receptor Fas, é uma proteína transmembranar pertencente à família do TNF alfa, que ligado ao seu receptor induz apoptose na célula alvo. Constitui, em conjunto com a via da perforina, os dois principais mecanismos pelos quais os linfócitos T citotóxicos induzem apoptose nas células alvo.

O mecanismo de apoptose induzido pelo Fasligando nalgumas células, como o hepatócito, requiere amplificação através da activação proteolítica da família proteica proapoptótica BCL-2. Está envolvida na via extrínseca da apoptose (também

conhecida como via do receptor de morte) , através da ligação do receptor FAS (CD 95) – receptor de morte celular - ao seu ligando, tendo um domínio de morte intracelular nas células alvo, o “FAS-associated death domain” (FADD).

Por sua vez, esta cascata activa o sistema das caspases, inicialmente pela activação da caspase 8 (caspase iniciadora), que posteriormente converge na activação caspase 3 (caspase executora), que será responsável pelas subseqüentes e características alterações morfológicas celulares da apoptose (133)..

- **ÓXIDO NÍTRICO SINTETASE INDUZIDA (iNOS)**

É um dos enzimas que catalisam a produção de óxido nítrico a partir da L-arginina, sendo uma molécula muito importante como sinalizadora celular. Actua independentemente do nível de cálcio.

A forma induzida (iNOS) está envolvida na resposta imunitária, produzindo óxido nítrico (NO) como mecanismo de defesa imunitária – porque o NO é um radical livre. É sintetizada por vários tipos celulares em resposta a citocinas, sendo um factor importante na resposta de defesa imunitária. O NO gerado por esta isoforma, pode exercer um efeito protector na lesão de I/R, na fase tardia, se bem que na fase precoce, pode ser protector ou lesivo, consoante a duração da isquemia e da reperfusão, ou consoante certas características do enxerto, nomeadamente a esteatose. Este gene não é habitualmente expresso, excepto em condições inflamatórias, nos hepatocitos, células de Kupfer, neutrófilos, linfócitos T e células endoteliais biliares. Um excesso de NO produzido por iNOS das células de Kupfer e dos neutrófilos, exacerba a lesão de IR através de citocinas pró-inflamatórias (134).

- **HEME OXIGENASE 1 INDUZIDA (HO1)**

Também conhecida como “Heath Shock Protein 32”, é um enzima que catalisa a degradação do heme, que produz biliverdina, ferro e monóxido de carbono. Pela sua acção, também é libertado ferro livre, o qual é eficazmente sequestrado pela ferritina, cuja expressão é simultaneamente aumentada, e exteriorizado do meio intracelular através de bombas dependentes de ATP.



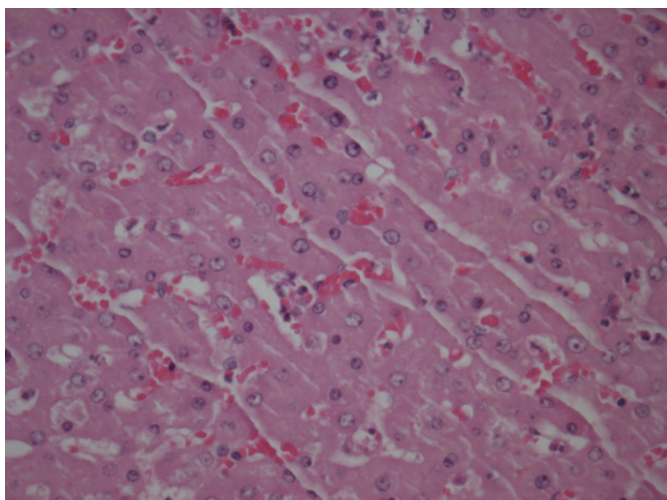
A isoforma induzida é produzida em resposta a stress, como o stress oxidativo, hipóxia ou por mediação de citocinas. É tipicamente expressada 3 ou mais horas após a reperfusão, e a sua acção, para além de antioxidativa, engloba vários mecanismos de protecção celular, como durante a inflamação, a hipóxia ou a hipertermia. A sua expressão basal é diminuta, excepto no baço, onde atinge níveis elevados.

É considerada como factor citoprotector, pela sua acção anti inflamatória, anti apoptótica e antiproliferativa em várias situações de insulto celular. Cada um dos três produtos resultantes da degradação do heme actua como citoprotector de maneira independente (135).

## **Anatomia Patológica**

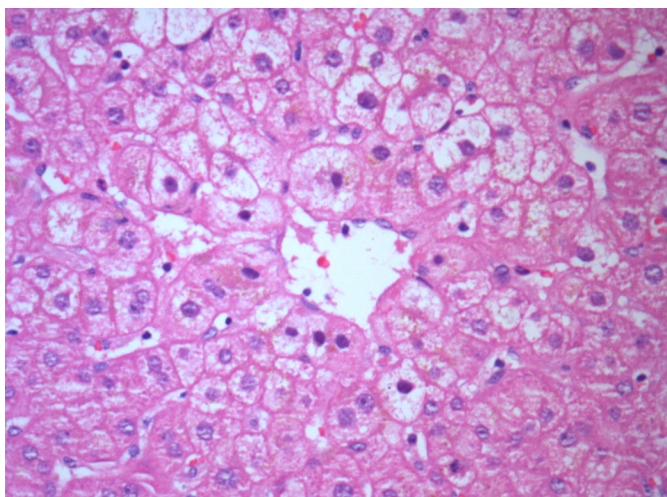
A extensão histológica da lesão hepática, causada pela isquémia de reperfusão, é avaliada, habitualmente, pela **classificação de Susuki** (136), que engloba os seguintes três parâmetros :

**Congestão sinusoidal** – Parâmetro que reflete as alterações da microcirculação nos sinusóides hepáticos. Sendo as células endoteliais sinusoidais muito sensíveis à isquémia fria, o seu citoplasma evolui para a vacuolização, alterando a morfologia do lúmen do sinusóide, levando a destacamento celular. Estas alterações agravam-se, com o recrutamento de células inflamatórias e a perda da matriz extracelular, lesão secundária dos hepatocitos (apoptose, necrose e seu destacamento para o lúmen), comprometendo ainda mais o fluxo microcirculatório nos sinusóides (Figura 4) (137, 138).



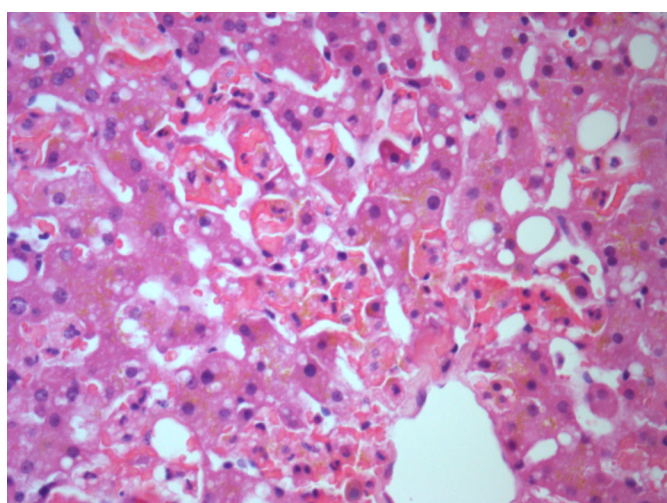
**Figura 4** – Congestão sinusoidal ligeira (Dra. Ana Carvalho, Serviço de Anatomia Patológica, HCC).

**Vacuolização/balonização** – Parâmetro reversível, habitualmente considerado como indicador de lesão hepatocelular importante. Está relacionado com a depleção dos níveis de ATP e com um aumento do cálcio intracelular, que conduz a uma desregulação do volume da membrana celular. Morfologicamente caracteriza-se por edema da célula, vacuolização do citoplasma, edema das mitocôndrias e aglutinação de filamentos (Figura 5) (139).



**Figura 5** – Balonização mínima (Dra. Ana Carvalho, Serviço de Anatomia Patológica, HCC).

**Necrose** – Com o evoluir das lesões reversíveis previamente descritas, o hepatocito entra num processo de irreversibilidade das lesões celulares, evoluindo para a morte, com extensas lesões de todas as membranas (nomeadamente as duas membranas mitocondriais) e profundas alterações morfológicas dos organocitos. Distingue-se da forma alternativa, mediada por vias imunológicas, de morte celular: a apoptose. Apesar de todo o conhecimento sobre a diferenciação entre os dois processos de morte celular, os aspectos morfológicos ainda constituem a base da distinção. A necrose envolve edema celular, vacuolização, cariólise e extravasamento do conteúdo celular (140) (Figura 6).

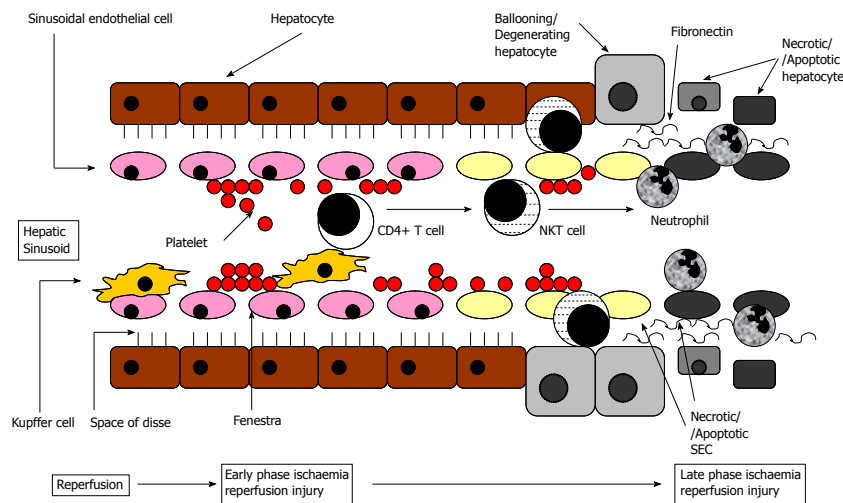


**Figura 6** – Necrose ligeira (Dra. Ana Carvalho, Serviço de Anatomia Patológica, HCC).

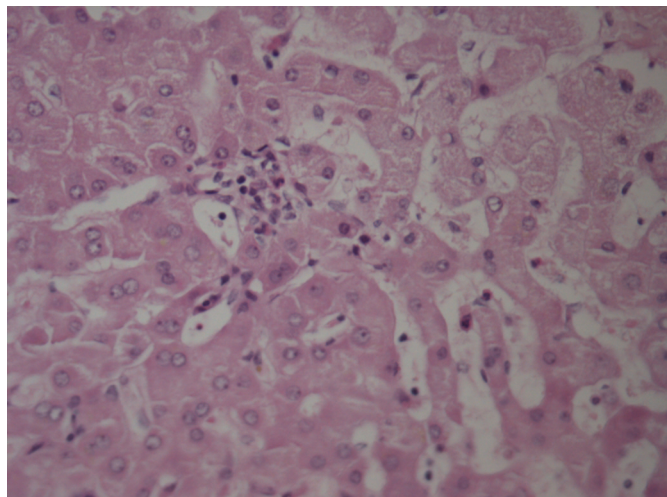
Para além dos três parâmetros histológicos que integram a classificação de Suzuki, outros dois são habitualmente estudados, por serem considerados fundamentais na avaliação da lesão de isquémia/reperfusão:

**infiltração neutrofílica** - Os neutrófilos são mediadores importantes de isquémia de reperfusão, contribuindo directamente para a lesão hepatocelular, embora em fases mais tardias, a partir das 6 horas (141). São, em conjunto com as células de Kupffer activadas, a maior fonte de ROS (espécies reactivas de oxigénio). Estas últimas sofrem uma activação logo aos 15 minutos de reperfusão, com subsequente amplificação na produção de ROS à medida que os neutrófilos são recrutados (142).

Nas fases mais tardias de isquemia de reperfusão, contribuem directamente para a lesão hepatocelular (143) (Figura 7 e Figura 8).



**Figura 7** – Diagrama esquemático dos mecanismos celulares hepáticos da lesão de isquemia / reperfusão dentro de um sinusóide hepático e área adjacente contendo hepatócitos (Adaptado de (143), *autorização de reprodução concedida*).



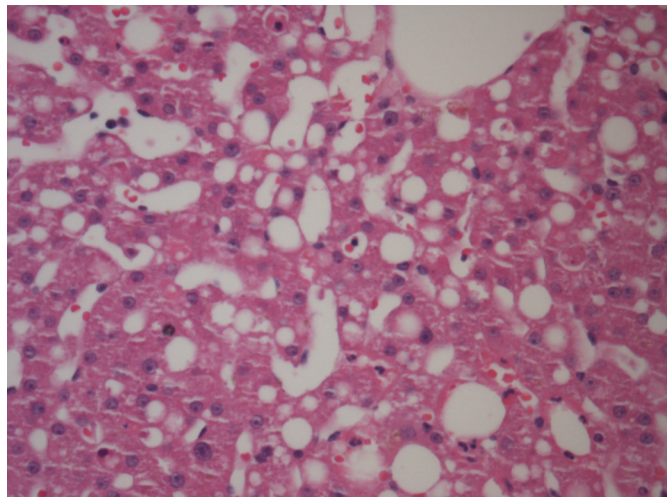
**Figura 8** – Ligeira infiltração por neutrófilos (Dra. Ana Carvalho, Serviço de Anatomia Patológica, HCC).

**Esteatose** - O grau de esteatose tem desde longa data sido associada a deficiente função inicial do enxerto, com impacto na sobrevida. Dadores com esteatose

macrovacuolar têm evolução menos favorável e maior risco de PNF, quando comparados com enxertos sem esteatose. É o resultado da acumulação anormal de triacilglicerol no citoplasma dos hepatocitos.

Vários factores são referidos na sua etiologia, como a idade, índice de massa corporal, o consumo de álcool ou sem causa definida.

Subdivide-se em macro e microvesicular: a macrovesicular, considerada reversível, define-se como um único vacúolo, que empurra o núcleo para um lado; a microvesicular, associada a deficiência da beta oxidação dos lípidos, define-se como múltiplas gotículas finamente dispersas no citoplasma (Figura 9). Fígados com esteatose moderada ou intensa continuam a ser um risco acrescido para os receptores (144).



**Figura 9** – Esteatose moderada (30 a 60%) (Dra. Ana Carvalho, Serviço de Anatomia Patológica, HCC).

Vários períodos distintos e sucessivos de agressão hepática ocorrem durante a colheita multiorgânica e transplantação, que podem, em graus diferentes, contribuir para a explicação do fenómeno de LIR:

- **Isquémia quente no dador** - Para além de toda a manipulação do enxerto até à canulação dos grandes vasos, o primeiro ocorre logo após a clampagem da aorta

na operação de colheita, nos momentos que antecedem o arrefecimento com gelo e a perfusão com soluto de preservação, denominado isquémia quente pura (à temperatura corporal de 37° C). Para além deste período, idealmente nulo e habitualmente muito curto, há que contar com outro tipo de isquémia quente na operação de colheita, do tipo denominado por reaquecimento, já sob a protecção do soluto de preservação, quando ocorre um atraso na hepatectomia e já se completou a perfusão fria (como por vezes sucede durante a colheita dos órgãos torácicos) (145).

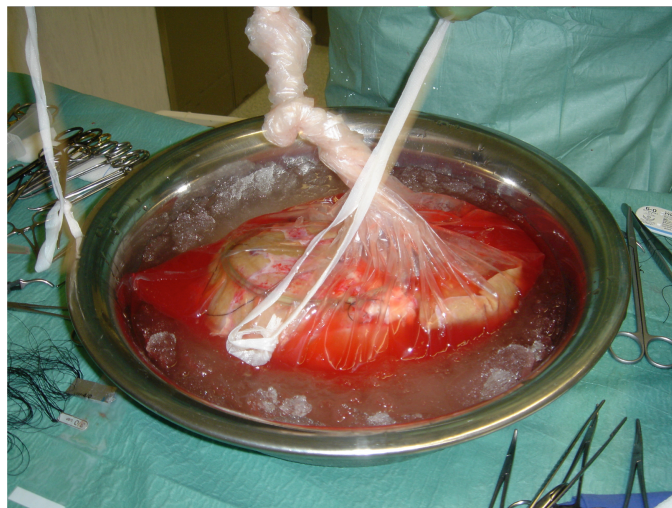
- **Isquémia fria** - Seguidamente, há que considerar outro tipo de agressão, após a explantação do enxerto do dador cadavérico, respectiva perfusão com líquido de preservação e armazenamento em gelo, com temperaturas entre os 0 e os 4 graus, de forma a permitir o seu transporte para os centros de transplantação (Figura 10). A hipotermia, apesar de se manter como um factor decisivo na manutenção da viabilidade do enxerto, pela redução do metabolismo celular para valores mínimos, acarreta também efeitos desfavoráveis, que são diminuídos pela solução de preservação (Celsior): edema celular e intersticial, acidose celular, e formação de radicais livres de oxigénio (146). Além destes efeitos, existe uma depleção do glicogénio e de adenosina trifosfato (ATP), afectando, em simultâneo, hepatocitos, células de Kupffer e células endoteliais sinusoidais (147). Refira-se que vários estudos demonstraram a temperatura entre -0.5 e 1°C como a ideal para o armazenamento de órgãos (148) (149), reconhecendo-se que algumas reacções proteolíticas ainda se realizam a 4°C (150), apesar da inibição completa da bomba de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> a essa temperatura (151). Porém, a redução da temperatura intra hepática abaixo dos 5°C é alcançada somente 75 a 100 minutos após o arrefecimento, e a sua estabilização a 1°C necessita de, pelo menos, 3 horas (152).
- A isquémia fria é fundamentalmente caracterizada por lesão dos sinusóides e do endotélio com desregulação da vascularização, e não tanto de dano hepatocelular. O grau de dano sinusoidal e do endotélio vascular correlaciona-se com o grau de disfunção do enxerto (153).



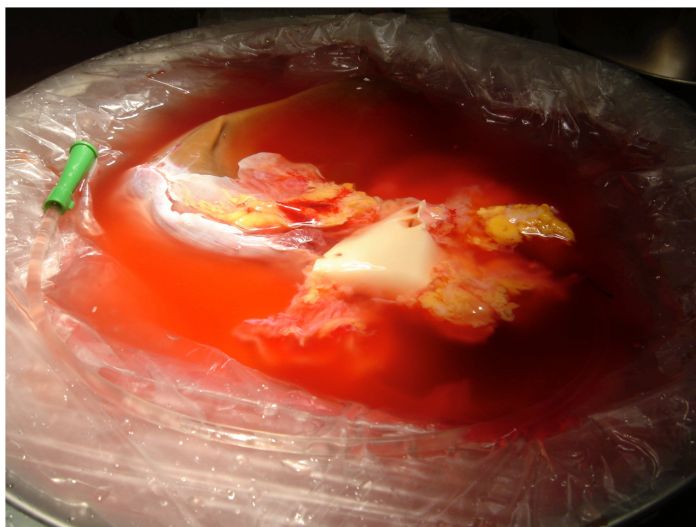


**Figura 10** – Transporte do enxerto hepático em recipiente isotérmico (CHBPT – HCC)

- De seguida o enxerto hepático é retirado do gelo, mantendo-se imerso em soluto de preservação, num ambiente arrefecido com gelo picado (Figuras 11 e 12), mas é sujeito a um reaquecimento discreto, devido a uma dissecação minuciosa dos pedículos e a uma limpeza cirúrgica de todos os tecidos adjacentes, consequência da técnica de colheita em bloco.



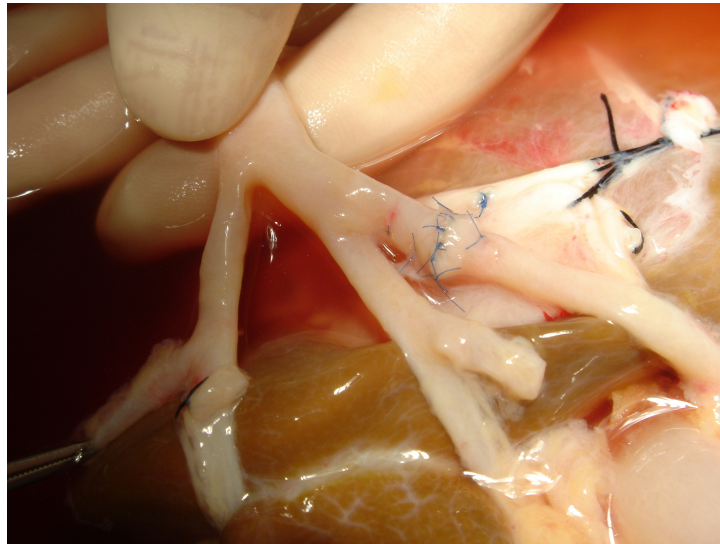
**Figura 11** – Enxerto hepático retirado do recipiente isotérmico, mas mantendo-se envolvido em ambiente gelado (CHBPT-HCC).



**Figura 12** – Enxerto hepático imerso em solução de preservação (Celsior), em ambiente gelado, e pronto para o início da dissecação em banca ou “Back-Table” (CHBPT-HCC).

Nesta fase, que cursa entre 1 e 2 horas em média, designada por trabalho de banca ou “back table”, são por vezes efectuadas reconstruções vasculares, de modo a permitir a fácil implantação do órgão, e também, de forma a permitir uma fácil hemostase, depois do implante (Figura 13). O gelo vai progressivamente derretendo, comprometendo a sua capacidade de manter o fígado com uma temperatura suficiente baixa, registando-se temperaturas entre os 0 e os 8° no soluto de preservação (149).

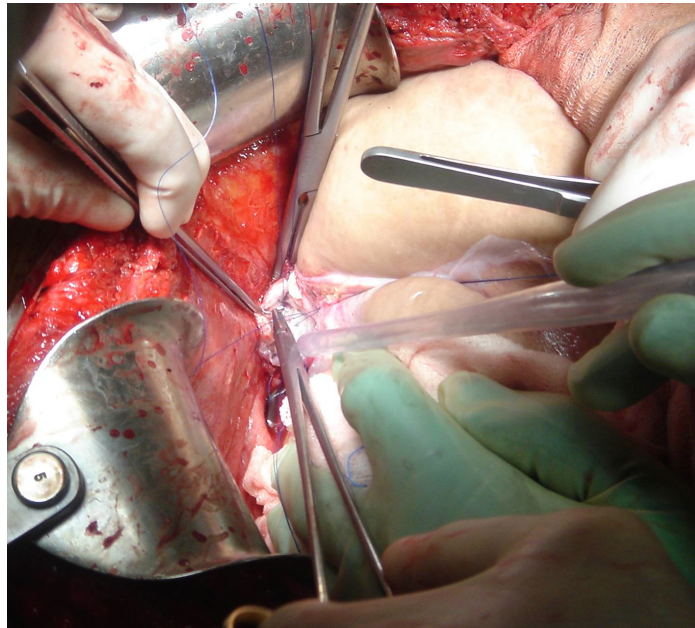




**Figura 13** – Reconstrução arterial em “Back Table” (CHBPT-HCC).

Após a conclusão do trabalho em banca, o enxerto é habitualmente recolocado no recipiente isotérmico em gelo, até ser retirado no final da hepatectomia do receptor, sendo esse momento registado como o final da isquémia fria (protocolo seguido no CHBPT-HCC).

***Isquémia quente no receptor*** - Terminada a hepatectomia no receptor (transplante ortotópico), o enxerto é retirado do gelo, na fase do transplante chamada anhepática, durante a qual se realizam as anastomoses (isquémia quente), reaquescendo a uma média de 0.5°C por minuto, raramente alcançando a temperatura corporal antes da reperfusão (145) (Figura 14). Neste período de reaquecimento do enxerto aumentam as necessidades metabólicas celulares, ainda sem o fornecimento de oxigénio e nutrientes; com vista à prevenção da lesão de reperfusão, que se segue a este período, estão descritas várias estratégias de lavagem do enxerto, com soluções cristalóides (protocolo cirúrgico seguido no CHBPT-HCC), soluções ligeiramente acidóticas incluindo adenosina (“Carolina Rinse Solution” (154)), ou contendo imunossuppressores (Tacrolimus, (155)), ou com sangue da veia porta.



**Figura 14** – Tempo de isquémia quente: anastomose das veias supra hepáticas, com o inevitável aquecimento do enxerto (CHBPT – HCC)

Nos momentos que antecedem a reperfusão, existem factores de risco relacionados com o receptor, que vão determinar o grau de LIR, nomeadamente o seu estado de preenchimento hemodinâmico: há que ter em conta que o fígado actua como um reservatório de sangue, contendo em média 250-500 ml (156), desencadeando uma importante e súbita alteração de volumes após as desclampagens. Um dos factores tidos como decisivos na compensação desta síndrome é um aumento da pré-carga, que garanta a manutenção dum débito cardíaco elevado, demonstrado por ecografia transesofágica (157).

Outro factor de risco, dependente do receptor, é o desempenho do miocárdio, que diminui após a reperfusão, face a uma diminuição da temperatura corporal, alterações electrolíticas e ácido/base, resultantes da entrada em circulação do soluto de preservação residual intrahepático, complementado pela acção do sangue de estase proveniente da relativa isquémia do território esplâncnico, após a desclampagem da veia porta (158). Finalmente o órgão é revascularizado e reaquece até à temperatura de cerca de 37 °C (reperfusão).

Após a reperfusão devemos ainda considerar 2 períodos distintos: o primeiro ocorre 1-2 horas após, caracterizado pela geração de espécies reactivas de oxigénio (ROS) e de azoto (ERA) que caracterizam a fase de inflamação com repercussão sistémica. O óxido nítrico produzido nesta fase conduz a um *stress* oxidativo que condiciona a disfunção mitocondrial.

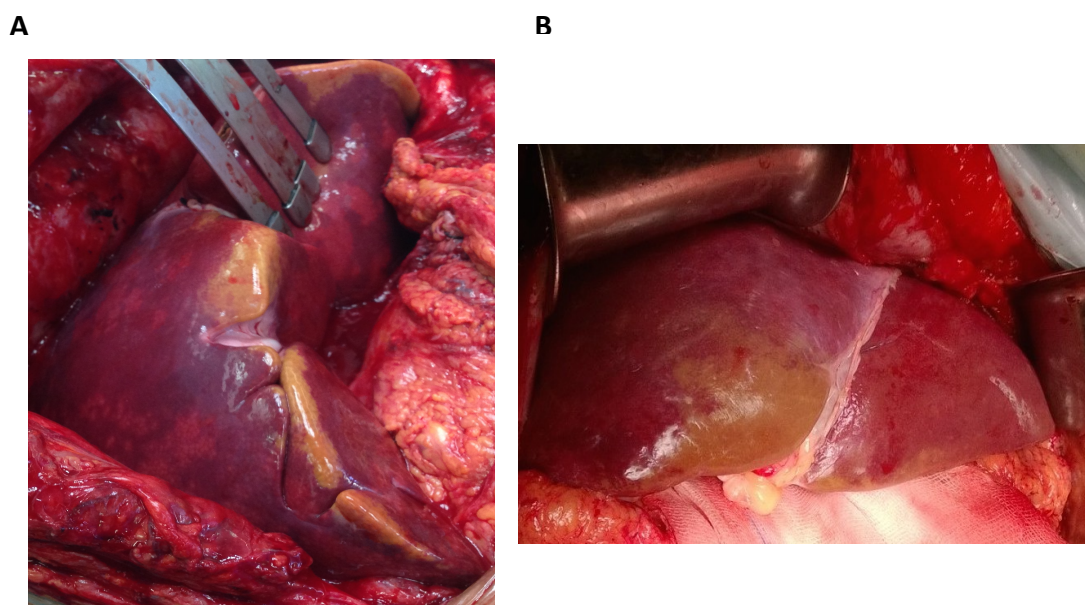
Nesta fase precoce, que habitualmente decorre até à conclusão da arterialização do enxerto, nota-se um fenómeno denominado de lesão de não revascularização (“no reflow”), associado a alta resistência vascular na microcirculação dentro do enxerto, devido a múltiplos factores como edema tissular, presença de pequenos trombos na veia porta e de colaterais venosos (shunts portosistémicos), que determinam a persistência de áreas dispersas no parênquima hepático ainda não revascularizadas, rodeadas doutras já sujeitas ao reaquecimento induzido pelo reestabelecimento da circulação, o que se traduz por lesões de verdadeira isquémia quente, com as consequências bioquímicas inerentes (159) (Figuras 15A e 15B).

Este fenómeno justifica-se, mais provavelmente, pelo edema do endotélio microvascular, pela hemoconcentração e ainda pela desregulação entre os mediadores vasoactivos (160). A desregulação deve-se à interacção entre elementos do sangue (plaquetas), células de Kupffer e hepatocitos, cuja sequência exacta ainda está por definir (161). Assim, a activação das células de Kupffer liberta, entre outras, moléculas vasoactivas como a endotelina 1 e o óxido nítrico (162).

O excesso de ROS leva ao desequilíbrio do balanço entre a produção daquelas moléculas a favor da endotelina. Esta substância provem, muito provavelmente, das células de Kupffer e das células estreladas, em resposta à hipóxia, às ROS, a outras citocinas proinflamatórias e aos lipopolissacáridos bacterianos. Motivado por este desequilíbrio, o estreitamento dos sinusóides leva à diminuição da perfusão, diminui a velocidade dos eritrocitos e conduz à estase; simultaneamente, as alterações da superfície dos sinusóides induz uma activação das plaquetas (163), seguida da activação dos leucócitos (164) e da indução de mecanismos complexos de apoptose (165).

Em consequência destas interacções, gera-se, também, outra alteração na microcirculação hepática conhecida por paradoxo da reperfusão (“reflow paradox”), que consiste na estase leucocitária por aderência ao endotélio pós capilar e das vénulas colectoras (166).

Também, as alterações do pH tissular modificam as lesões pós reperfusão: a acidose desencadeada pela hipóxia e pela isquémia adia o processo de morte celular por necrose, conferindo uma protecção que se perde após a reperfusão, quando se normaliza o pH (167). Paradoxalmente, a reperfusão desencadeia necrose celular pela correcção da acidose, tornando-se os hepatocitos e as células endoteliais vulneráveis às alterações de pH, respectivamente pela isquémia quente e fria (168).



**Figura 15 A e B** - Após a reperfusão do enxerto, persistem áreas não reperfundidas (“no reflow”) – CHBPT-HCC

Outro período mais tardio, 6 a 48 horas depois, é caracterizado por lesão celular e activação de células imunocompetentes, tais como os macrófagos residentes (células de Kupffer) e neutrófilos (169, 170).

O *stress* oxidativo condiciona a lesão celular por peroxidação lipídica do ADN, desnaturação enzimática e activação de sinalização intracelular para morte celular programada (apoptose) (41).

As lesões biliares após o transplante são um conjunto de alterações com uma incidência estimada entre 10% e 30%, que condicionam a função de enxerto, perda de enxerto e retransplante (171-174). As relacionadas com LIR são classificadas como lesão biliar associada à isquémia ou colangite isquémica. É associada a tempos de isquémia prolongadas, doação em dador de coração parado e incompatibilidade ABO. A sua incidência é de 5% a 15% (175, 176).

Também a presença de sais biliares citotóxicos pode levar a lesão celular. A desproporção entre sais biliares e relativa pobreza em fosfolípidos, comum após o transplante hepático, promove o *stress* oxidativo. Os fenómenos de isquémia/reperfusão agravam este problema através da lesão dos canálculos biliares (perda de microvilusidades e estenoses induzidas por isquémia em canálculos biliares periféricos de pequeno calibre), comprometendo a excreção biliar e normal funcionamento da árvore biliar no seu todo (177, 178).

As consequências da LIR podem ser sérias. Estes doentes requerem mais transfusões sanguíneas, tem maior grau de fibrinólise, maior incidência de retransplante por disfunção de enxerto e maior incidência de problemas renais (53, 175).

Os factores de risco associados são a idade do dador, tempos de isquémia prolongados, explantação de fígados de dador em paragem cardíaca, esteatose e utilização prolongada de vasopressores (179, 180).

**Quadro 1.** Estudos clínicos sobre lesão de isquemia reperfusão após o transplante hepático.

<b>Autores</b>	<b>desenho</b>	<b>doentes (n)</b>	<b>Definição</b>	<b>Incidência</b>
Nanashima A et al (181)	Retrospectivo	100	Decréscimo na PAM >30% após a reperfusão com duração superior a 5 minutos	29%
Hilmi, I. et al. (53)	Retrospectivo	338	Ligeira: diminuição da PAM e/ou da FC em pelo menos 30% abaixo dos valores prévios e não superior a 5 minutos, com resposta à infusão de cloreto de sódio ou bolus de noradrenalina. Severa: hipotensão persistente, arritmia/assistolia e/ou necessidade de infusão contínua de vasopressores	Alterações em todos os doentes; severas em 55%
Paugam-Burtz C., et al. (175)	Prospectivo, observacional	75	Descida da PAM em 30% no final da fase anhepática durante pelo menos 1 minuto ou durante 5 minutos depois da desclampagem	25%
Bukowicka, B. et al. (182)	Retrospectivo	340		12.1%
Chui, A., et al. (183)	Retrospectivo	321	Descida da PAM < 60 mmHg com disfunção hemodinâmica 5 minutos pós revascularização	12.8%
Fukazawa, K. et al. (184)	Retrospectivo	557	Descida da PAM > 30% na fase anhepática nos primeiros 5 minutos e mantida > 1 minuto	55.7%
Pertejo, M.A., et al. (185)	Retrospectivo	551		16-27%

## Referências

1. Starzl TE, Miller C, Broznick B, Makowka L. An improved technique for multiple organ harvesting. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1987;165(4):343-8.
2. Starzl TE, Klintmalm GB, Porter KA, Iwatsuki S, Schroter GP. Liver transplantation with use of cyclosporin a and prednisone. *The New England journal of medicine*. 1981;305(5):266-9.
3. Abecassis MM, Burke R, Klintmalm GB, Matas AJ, Merion RM, Millman D, et al. American Society of Transplant Surgeons transplant center outcomes requirements--a threat to innovation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2009;9(6):1279-86.
4. Kim WR, Stock PG, Smith JM, Heimbach JK, Skeans MA, Edwards EB, et al. OPTN/SRTR 2011 Annual Data Report: liver. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013;13 Suppl 1:73-102.
5. O'Grady JG, Alexander GJ, Hayllar KM, Williams R. Early indicators of prognosis in fulminant hepatic failure. *Gastroenterology*. 1989;97(2):439-45.
6. Bernuau J, Benhamou JP. Fulminant and subfulminant liver failure. In: McIntyre N, Benhamou JP, Bircher J, Rizzeto M, Rodes J, editors. *Oxford Textbook of Clinical Hepatology*. Oxford: Oxford Medical Publications; 1991. p. 923-42.
7. Starzl TE, Iwatsuki S, Van Thiel DH, Gartner JC, Zitelli BJ, Malatack JJ, et al. Evolution of liver transplantation. *Hepatology*. 1982;2(5):614-36.
8. Broelsch CE, Whittington PF, Emond JC, Heffron TG, Thistlethwaite JR, Stevens L, et al. Liver transplantation in children from living related donors. *Surgical techniques and results. Annals of surgery*. 1991;214(4):428-37; discussion 37-9.
9. Furtado A, Tome L, Oliveira FJ, Furtado E, Viana J, Perdigoto R. Sequential liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 1997;29(1-2):467-8.
10. Malinchoc M, Kamath PS, Gordon FD, Peine CJ, Rank J, ter Borg PC. A model to predict poor survival in patients undergoing transjugular intrahepatic portosystemic shunts. *Hepatology*. 2000;31(4):864-71.
11. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, et al. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. *Hepatology*. 2001;33(2):464-70.
12. Wiesner RH, McDiarmid SV, Kamath PS, Edwards EB, Malinchoc M, Kremers WK, et al. MELD and PELD: application of survival models to liver allocation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2001;7(7):567-80.
13. Kim WR, Biggins SW, Kremers WK, Wiesner RH, Kamath PS, Benson JT, et al. Hyponatremia and mortality among patients on the liver-transplant waiting list. *The New England journal of medicine*. 2008;359(10):1018-26.
14. Luca A, Angermayr B, Bertolini G, Koenig F, Vizzini G, Ploner M, et al. An integrated MELD model including serum sodium and age improves the prediction of early mortality in

patients with cirrhosis. Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society. 2007;13(8):1174-80.

15. Barber K, Madden S, Allen J, Collett D, Neuberger J, Gimson A, et al. Elective liver transplant list mortality: development of a United Kingdom end-stage liver disease score. Transplantation. 2011;92(4):469-76.

16. Wiesner R, Edwards E, Freeman R, Harper A, Kim R, Kamath P, et al. Model for end-stage liver disease (MELD) and allocation of donor livers. Gastroenterology. 2003;124(1):91-6.

17. Weismuller TJ, Negm A, Becker T, Barg-Hock H, Klempnauer J, Manns MP, et al. The introduction of MELD-based organ allocation impacts 3-month survival after liver transplantation by influencing pretransplant patient characteristics. Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation. 2009;22(10):970-8.

18. Waki K. UNOS Liver Registry: ten year survivals. Clinical transplants. 2006:29-39.

19. Weismuller TJ, Fikatas P, Schmidt J, Barreiros AP, Otto G, Beckebaum S, et al. Multicentric evaluation of model for end-stage liver disease-based allocation and survival after liver transplantation in Germany--limitations of the 'sickest first'-concept. Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation. 2011;24(1):91-9.

20. Busquets J, Xiol X, Figueras J, Jaurrieta E, Torras J, Ramos E, et al. The impact of donor age on liver transplantation: influence of donor age on early liver function and on subsequent patient and graft survival. Transplantation. 2001;71(12):1765-71.

21. Lee KW, Cameron AM, Maley WR, Segev DL, Montgomery RA. Factors affecting graft survival after adult/child split-liver transplantation: analysis of the UNOS/OPTN data base. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2008;8(6):1186-96.

22. Halldorson JB, Bakthavatsalam R, Fix O, Reyes JD, Perkins JD. D-MELD, a simple predictor of post liver transplant mortality for optimization of donor/recipient matching. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2009;9(2):318-26.

23. Feng S, Goodrich NP, Bragg-Gresham JL, Dykstra DM, Punch JD, DeRoy MA, et al. Characteristics associated with liver graft failure: the concept of a donor risk index. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2006;6(4):783-90.

24. Rana A, Hardy MA, Halazun KJ, Woodland DC, Ratner LE, Samstein B, et al. Survival outcomes following liver transplantation (SOFT) score: a novel method to predict patient survival following liver transplantation. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2008;8(12):2537-46.

25. Dutkowski P, Oberkofler CE, Slankamenac K, Puhan MA, Schadde E, Mullhaupt B, et al. Are there better guidelines for allocation in liver transplantation? A novel score targeting justice and utility in the model for end-stage liver disease era. Annals of surgery. 2011;254(5):745-53; discussion 53.



26. Avolio AW, Halldorson JB, Burra P, Dutkowski P, Agnes S, Clavien PA. Balancing utility and need by means of donor-to-recipient matching: a challenging problem. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013;13(2):522-3.
27. Dutkowski P, Schlegel A, Slankamenac K, Oberkofler CE, Adam R, Burroughs AK, et al. The use of fatty liver grafts in modern allocation systems: risk assessment by the balance of risk (BAR) score. *Annals of surgery*. 2012;256(5):861-8; discussion 8-9.
28. Francoz C, Belghiti J, Castaing D, Chazouilleres O, Duclos-Vallee JC, Duvoux C, et al. Model for end-stage liver disease exceptions in the context of the French model for end-stage liver disease score-based liver allocation system. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2011;17(10):1137-51.
29. Pomfret EA, Washburn K, Wald C, Nalesnik MA, Douglas D, Russo M, et al. Report of a national conference on liver allocation in patients with hepatocellular carcinoma in the United States. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2010;16(3):262-78.
30. Durand F, Renz JF, Alkofer B, Burra P, Clavien PA, Porte RJ, et al. Report of the Paris consensus meeting on expanded criteria donors in liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2008;14(12):1694-707.
31. Stahl JE, Kreke JE, Malek FA, Schaefer AJ, Vacanti J. Consequences of cold-ischemia time on primary nonfunction and patient and graft survival in liver transplantation: a meta-analysis. *PloS one*. 2008;3(6):e2468.
32. Alexander JW, Zola JC. Expanding the donor pool: use of marginal donors for solid organ transplantation. *Clinical transplantation*. 1996;10(1 Pt 1):1-19.
33. Carrel A, Lindbergh CA. *The culture of organs*. New York: Harper & Brothers; 1938.
34. Guarrera JV, Henry SD, Samstein B, Odeh-Ramadan R, Kinkhabwala M, Goldstein MJ, et al. Hypothermic machine preservation in human liver transplantation: the first clinical series. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2010;10(2):372-81.
35. Roberts MS, Angus DC, Bryce CL, Valenta Z, Weissfeld L. Survival after liver transplantation in the United States: a disease-specific analysis of the UNOS database. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2004;10(7):886-97.
36. Lock JF, Schwabauer E, Martus P, Videv N, Pratschke J, Malinowski M, et al. Early diagnosis of primary nonfunction and indication for reoperation after liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2010;16(2):172-80.
37. Burton JR, Jr., Rosen HR. Diagnosis and management of allograft failure. *Clinics in liver disease*. 2006;10(2):407-35, x.

38. Zhai Y, Petrowsky H, Hong JC, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Ischaemia-reperfusion injury in liver transplantation--from bench to bedside. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*. 2013;10(2):79-89.
39. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation*. 1988;45(4):673-6.
40. Jaeschke H. Reactive oxygen and mechanisms of inflammatory liver injury: Present concepts. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2011;26 Suppl 1:173-9.
41. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury: ROS within and without. *Circulation research*. 2000;86(2):117-8.
42. Singer G, Stokes KY, Neil Granger D. Reactive oxygen and nitrogen species in sepsis-induced hepatic microvascular dysfunction. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*. 2013;62(2):155-64.
43. Novo E, Parola M. The role of redox mechanisms in hepatic chronic wound healing and fibrogenesis. *Fibrogenesis & tissue repair*. 2012;5 Suppl 1:S4.
44. Diesen DL, Kuo PC. Nitric oxide and redox regulation in the liver: part II. Redox biology in pathologic hepatocytes and implications for intervention. *The Journal of surgical research*. 2011;167(1):96-112.
45. Petrowsky H. Organ procurement and preservation: what is new and what is established? *Current opinion in organ transplantation*. 2014;19(2):83-4.
46. Rao J, Lu L, Zhai Y. T cells in organ ischemia reperfusion injury. *Current opinion in organ transplantation*. 2014;19(2):115-20.
47. Zhai Y, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Liver ischemia and reperfusion injury: new insights into mechanisms of innate-adaptive immune-mediated tissue inflammation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2011;11(8):1563-9.
48. Aggarwal S, Kang Y, Freeman JA, Fortunato FL, Pinsky MR. Postreperfusion syndrome: cardiovascular collapse following hepatic reperfusion during liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 1987;19(4 Suppl 3):54-5.
49. Tzakis A, Todo S, Starzl TE. Orthotopic liver transplantation with preservation of the inferior vena cava. *Annals of surgery*. 1989;210(5):649-52.
50. Jones R, Hardy KJ, Fletcher DR, Michell I, McNicol PL, Angus PW. Preservation of the inferior vena cava in orthotopic liver transplantation with selective use of veno-venous bypass: the piggy back operation. *Transplantation proceedings*. 1992;24(1):189-91.
51. Gurusamy KS, Pamecha V, Davidson BR. Piggy-back graft for liver transplantation. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2011(1):CD008258.
52. Fukazawa K, Pretto EA. The effect of methylene blue during orthotopic liver transplantation on post reperfusion syndrome and postoperative graft function. *Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences*. 2011;18(3):406-13.
53. Hilmi I, Horton CN, Planinsic RM, Sakai T, Nicolau-Raducu R, Damian D, et al. The impact of postreperfusion syndrome on short-term patient and liver allograft outcome in patients undergoing orthotopic liver transplantation. *Liver transplantation : official*

publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society. 2008;14(4):504-8.

54. Fukazawa K, Pretto EA. The postreperfusion syndrome (PRS): diagnosis, incident and management. In: Abdeldayem H, Allam N, editors. Liver transplantation - Basic issues. Croatia: inTech; 2011. p. 386-96.

55. Bugge JF. Brain death and its implications for management of the potential organ donor. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*. 2009;53(10):1239-50.

56. Watts RP, Thom O, Fraser JF. Inflammatory signalling associated with brain dead organ donation: from brain injury to brain stem death and posttransplant ischaemia reperfusion injury. *Journal of transplantation*. 2013;2013:521369.

57. Peralta C, Jimenez-Castro MB, Gracia-Sancho J. Hepatic ischemia and reperfusion injury: effects on the liver sinusoidal milieu. *Journal of hepatology*. 2013;59(5):1094-106.

58. A definition of irreversible coma. Report of the Ad Hoc Committee of the Harvard Medical School to Examine the Definition of Brain Death. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 1968;205(6):337-40.

59. Cecka JM. Outcome statistics of renal transplants with an emphasis on long-term survival. *Clinical transplantation*. 1994;8(3 Pt 2):324-7.

60. Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW, Takemoto S. High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. *The New England journal of medicine*. 1995;333(6):333-6.

61. Reding R, Wallemacq P, Moulin D, Manicourt D, Lambotte L, Jamart J, et al. Early hepatocyte, endothelial, and bile duct cell injury after pediatric liver transplantation from cadaveric or living-related donors. *Transplantation*. 1998;65(5):681-5.

62. Barklin A, Larsson A, Vestergaard C, Koefoed-Nielsen J, Bach A, Nyboe R, et al. Does brain death induce a pro-inflammatory response at the organ level in a porcine model? *Acta anaesthesiologica Scandinavica*. 2008;52(5):621-7.

63. Kuecuk O, Mantouvalou L, Klemz R, Kotsch K, Volk HD, Jonas S, et al. Significant reduction of proinflammatory cytokines by treatment of the brain-dead donor. *Transplantation proceedings*. 2005;37(1):387-8.

64. Mangino MJ, Kosieradzki M, Gilligan B, Woo H, Southard JH. The effects of donor brain death on renal function and arachidonic acid metabolism in a large animal model of hypothermic preservation injury. *Transplantation*. 2003;75(10):1640-7.

65. Barklin A, Hvas CL, Toennesen E. The inflammatory response to brain dead. In: Novitzky D, Cooper DKC, editors. *The brain-dead organ donor: pathophysiology and management*. New York: Springer Science; 2013. p. 107-19.

66. Wheeldon DR, Potter CD, Oduro A, Wallwork J, Large SR. Transforming the "unacceptable" donor: outcomes from the adoption of a standardized donor management technique. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 1995;14(4):734-42.

67. Lu J, Goh SJ, Tng PYL, Deng YY, Ling E, Mochhala S. Systemic inflammatory response following acute traumatic brain injury. *Frontiers in Bioscience*. 2009;14(10):3798-813.

68. Graetz D, Nagel A, Schlenk F, Sakowitz O, Vajkoczy P, Sarrafzadeh A. High ICP as trigger of proinflammatory IL-6 cytokine activation in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurological research*. 2010;32(7):728-35.
69. Koudstaal LG, t Hart NA, Ottens PJ, van den Berg A, Ploeg RJ, van Goor H, et al. Brain death induces inflammation in the donor intestine. *Transplantation*. 2008;86(1):148-54.
70. The Quality Standards Subcommittee of the American Academy of Neurology. 1945;45.
71. Venkateswaran RV, Dronavalli V, Lambert PA, Steeds RP, Wilson IC, Thompson RD, et al. The proinflammatory environment in potential heart and lung donors: prevalence and impact of donor management and hormonal therapy. *Transplantation*. 2009;88(4):582-8.
72. Cushing H. Concerning a definite regulatory mechanism of the vaso-motor centre which controls blood pressure during cerebral compression. *The Johns Hopkins Hospital Bulletin*. 1901;12.
73. Dictus C, Vienenkoetter B, Esmaeilzadeh M, Unterberg A, Ahmadi R. Critical care management of potential organ donors: our current standard. *Clinical transplantation*. 2009;23 Suppl 21:2-9.
74. Avlonitis VS, Wigfield CH, Kirby JA, Dark JH. The hemodynamic mechanisms of lung injury and systemic inflammatory response following brain death in the transplant donor. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2005;5(4 Pt 1):684-93.
75. Chamorro C, Falcon JA, Michelena JC. Controversial points in organ donor management. *Transplantation proceedings*. 2009;41(8):3473-5.
76. Gramm HJ, Meinhold H, Bickel U, Zimmermann J, von Hammerstein B, Keller F, et al. Acute endocrine failure after brain death? *Transplantation*. 1992;54(5):851-7.
77. Power BM, Van Heerden PV. The physiological changes associated with brain death--current concepts and implications for treatment of the brain dead organ donor. *Anaesthesia and intensive care*. 1995;23(1):26-36.
78. Jassem W, Koo DD, Cerundolo L, Rela M, Heaton ND, Fuggle SV. Leukocyte infiltration and inflammatory antigen expression in cadaveric and living-donor livers before transplant. *Transplantation*. 2003;75(12):2001-7.
79. van der Hoeven JA, Ploeg RJ, Postema F, Molema G, de Vos P, Girbes AR, et al. Induction of organ dysfunction and activation of inflammatory markers in donor liver and kidney during hypotensive brain death. *Transplantation proceedings*. 1999;31(1-2):1006-7.
80. Kotsch K, Ulrich F, Reutzel-Selke A, Pascher A, Faber W, Warnick P, et al. Methylprednisolone therapy in deceased donors reduces inflammation in the donor liver and improves outcome after liver transplantation: a prospective randomized controlled trial. *Annals of surgery*. 2008;248(6):1042-50.
81. Kusaka M, Pratschke J, Wilhelm MJ, Ziai F, Zandi-Nejad K, Mackenzie HS, et al. Activation of inflammatory mediators in rat renal isografts by donor brain death. *Transplantation*. 2000;69(3):405-10.
82. van der Hoeven JA, Ploeg RJ, Postema F, Molema I, de Vos P, Girbes AR, et al. Induction of organ dysfunction and up-regulation of inflammatory markers in the liver and

kidneys of hypotensive brain dead rats: a model to study marginal organ donors. *Transplantation*. 1999;68(12):1884-90.

83. Minambres E, Cemborain A, Sanchez-Velasco P, Gandarillas M, Diaz-Reganon G, Sanchez-Gonzalez U, et al. Correlation between transcranial interleukin-6 gradient and outcome in patients with acute brain injury. *Critical care medicine*. 2003;31(3):933-8.

84. Simas R, Silva IA, Menegate L. Inhibition of autonomic storm does not improve microcirculatory impairment and inflammatory response in brain dead rats. *Transpl Intern*. 2013;26(Suppl.2):204.

85. Arias IM, Che M, Gatmaitan Z, Leveille C, Nishida T, St Pierre M. The biology of the bile canaliculus, 1993. *Hepatology*. 1993;17(2):318-29.

86. Steiner JW, Perz ZM, Taichman LB. Cell population dynamics in the liver. A review of quantitative morphological techniques applied to the study of physiological and pathological growth. *Experimental and molecular pathology*. 1966;5(2):146-81.

87. Sheikh N, Tron K, Dudas J, Ramadori G. Cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 is released by the noninjured liver in a rat acute-phase model. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2006;86(8):800-14.

88. Tron K, Novosyadlyy R, Dudas J, Samoylenko A, Kietzmann T, Ramadori G. Upregulation of heme oxygenase-1 gene by turpentine oil-induced localized inflammation: involvement of interleukin-6. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2005;85(3):376-87.

89. Jungermann K, Kietzmann T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annual review of nutrition*. 1996;16:179-203.

90. Cherid A, Cherid N, Chamlian V, Hardwigsen J, Nouhou H, Dodero F, et al. Evaluation of glycogen loss in human liver transplants. *Histochemical zonation of glycogen loss in cold ischemia and reperfusion. Cellular and molecular biology*. 2003;49(4):509-14.

91. Schon MR, Kollmar O, Akkoc N, Matthes M, Wolf S, Schrem H, et al. Cold ischemia affects sinusoidal endothelial cells while warm ischemia affects hepatocytes in liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 1998;30(5):2318-20.

92. Arai S, Imamura M. Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*. 2000;7(1):40-8.

93. Wake K. Sinusoidal structure and dynamics. In: F. V-V, editor. *Functional heterogeneity of liver tissue*. Texas: R.G. Landes Company; 1997. p. 57-67.

94. Rockey DC, Chung JJ. Regulation of inducible nitric oxide synthase in hepatic sinusoidal endothelial cells. *The American journal of physiology*. 1996;271(2 Pt 1):G260-7.

95. Knolle PA, Germann T, Treichel U, Uhrig A, Schmitt E, Hegenbarth S, et al. Endotoxin down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells. *Journal of immunology*. 1999;162(3):1401-7.

96. Okouchi Y, Sasaki K, Tamaki T. Ultrastructural changes in hepatocytes, sinusoidal endothelial cells and macrophages in hypothermic preservation of the rat liver with University of Wisconsin solution. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 1994;424(5):477-84.

97. Sun X, Kimura T, Kobayashi T, Noriki S, Imamura Y, Fukuda M, et al. Viability of liver grafts from fasted donor rats: relationship to sinusoidal endothelial cell apoptosis. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*. 2001;8(3):268-73.
98. Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation*. 1999;67(8):1099-105.
99. Sherlock S. Diseases of the liver and biliary system. 11th ed: Malden: BlackwellScience; 2002.
100. Levine RA, Hall RC. Cyclic AMP in secretin choleresis. Evidence for a regulatory role in man and baboons but not in dogs. *Gastroenterology*. 1976;70(4):537-44.
101. Roberts SK, Ludwig J, Larusso NF. The pathobiology of biliary epithelia. *Gastroenterology*. 1997;112(1):269-79.
102. Luo Y, Ji WB, Duan WD, Ye S, Dong JH. Graft cholangiopathy: etiology, diagnosis, and therapeutic strategies. *Hepatobiliary & pancreatic diseases international : HBPD INT*. 2014;13(1):10-7.
103. Marzioni M, Saccomanno S, Candelaresi C, Rychlicki C, Agostinelli L, Trozzi L, et al. Clinical implications of novel aspects of biliary pathophysiology. *Digestive and liver disease : official journal of the Italian Society of Gastroenterology and the Italian Association for the Study of the Liver*. 2010;42(4):238-44.
104. Phillips MJ, Poucel S, Patterson J. The liver: an atlas and text of ultrastructural pathology. New York: Raven; 1987.
105. Fox ES, Thomas P, Broitman SA. Comparative studies of endotoxin uptake by isolated rat Kupffer and peritoneal cells. *Infection and immunity*. 1987;55(12):2962-6.
106. Laskin DL, Weinberger B, Laskin JD. Functional heterogeneity in liver and lung macrophages. *Journal of leukocyte biology*. 2001;70(2):163-70.
107. Su GL. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2002;283(2):G256-65.
108. Jaeschke H. Role of reactive oxygen species in hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*. 2003;16(3):127-40.
109. Rymsa B, Wang JF, de Groot H. O<sub>2</sub><sup>-</sup> release by activated Kupffer cells upon hypoxia-reoxygenation. *The American journal of physiology*. 1991;261(4 Pt 1):G602-7.
110. Yokoyama I, Todo S, Miyata T, Selby R, Tzakis AG, Starzl TE. Endotoxemia and human liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 1989;21(5):3833-41.
111. Hepatic stellate cell nomenclature. *Hepatology*. 1996;23(1):193.
112. Wake K. Liver perivascular cells revealed by gold and silver impregnation methods and electron microscopy. In: Motta P, editor. *Biopathology of the liver, an ultrastructural approach*. Dordrecht: Kluwer; 1988. p. 23-6.
113. Blomhoff R, Green MH, Berg T, Norum KR. Transport and storage of vitamin A. *Science*. 1990;250(4979):399-404.

114. De Minicis S, Seki E, Uchinami H, Kluwe J, Zhang Y, Brenner DA, et al. Gene expression profiles during hepatic stellate cell activation in culture and in vivo. *Gastroenterology*. 2007;132(5):1937-46.
115. Volloch V, Kaplan D. Matrix-mediated cellular rejuvenation. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*. 2002;21(6):533-43.
116. Nakata K. Microcirculation - an update. New York: Elsevier: Elsevier; 1987. 339-44 p.
117. Kawada N, Tran-Thi TA, Klein H, Decker K. The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1993;213(2):815-23.
118. Gao B, Radaeva S, Park O. Liver natural killer and natural killer T cells: immunobiology and emerging roles in liver diseases. *Journal of leukocyte biology*. 2009;86(3):513-28.
119. Crispe IN. The liver as a lymphoid organ. *Annual review of immunology*. 2009;27:147-63.
120. Norris S, Collins C, Doherty DG, Smith F, McEntee G, Traynor O, et al. Resident human hepatic lymphocytes are phenotypically different from circulating lymphocytes. *Journal of hepatology*. 1998;28(1):84-90.
121. Heikenwalder M, Knoll P, Protzer U. Innate uimmunity and disorders of the liver. In: Gershwin ME, Vierling JM, Manns MP, editors. *Liver Immunology: principles and practice*. 2nd ed. New York: Springer; 2014. p. 65-77.
122. Alegre ML, Frauwirth KA, Thompson CB. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nature reviews Immunology*. 2001;1(3):220-8.
123. LaRock CN, Cookson BT. Burning down the house: cellular actions during pyroptosis. *PLoS pathogens*. 2013;9(12):e1003793.
124. Lopez-Castejon G, Brough D. Understanding the mechanism of IL-1beta secretion. *Cytokine & growth factor reviews*. 2011;22(4):189-95.
125. Piccioli P, Rubartelli A. The secretion of IL-1beta and options for release. *Seminars in immunology*. 2013;25(6):425-9.
126. Shuh M, Bohorquez H, Loss GE, Jr., Cohen AJ. Tumor Necrosis Factor-alpha: Life and Death of Hepatocytes During Liver Ischemia/Reperfusion Injury. *The Ochsner journal*. 2013;13(1):119-30.
127. Ke B, Shen XD, Lassman CR, Gao F, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. Cytoprotective and antiapoptotic effects of IL-13 in hepatic cold ischemia/reperfusion injury are heme oxygenase-1 dependent. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2003;3(9):1076-82.
128. Li-Weber M, Krammer PH. Regulation of IL4 gene expression by T cells and therapeutic perspectives. *Nature reviews Immunology*. 2003;3(7):534-43.
129. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal*. 2003;374(Pt 1):1-20.

130. Voskoboinik I, Dunstone MA, Baran K, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin: structure, function, and role in human immunopathology. *Immunological reviews*. 2010;235(1):35-54.
131. Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annual review of immunology*. 2008;26:389-420.
132. Chase SD, Magnani JL, Simon SI. E-selectin ligands as mechanosensitive receptors on neutrophils in health and disease. *Annals of biomedical engineering*. 2012;40(4):849-59.
133. Strasser A, Jost PJ, Nagata S. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity*. 2009;30(2):180-92.
134. Hickok JR, Vasudevan D, Jablonski K, Thomas DD. Oxygen dependence of nitric oxide-mediated signaling. *Redox biology*. 2013;1(1):203-9.
135. Yun N, Cho HI, Lee SM. Impaired autophagy contributes to hepatocellular damage during ischemia/reperfusion: heme oxygenase-1 as a possible regulator. *Free radical biology & medicine*. 2014;68:168-77.
136. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation*. 1993;55(6):1265-72.
137. Bilzer M, Gerbes AL. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *Journal of hepatology*. 2000;32(3):508-15.
138. Huet PM, Nagaoka MR, Desbiens G, Tarrab E, Brault A, Bralet MP, et al. Sinusoidal endothelial cell and hepatocyte death following cold ischemia-warm reperfusion of the rat liver. *Hepatology*. 2004;39(4):1110-9.
139. Abraham S, Furth EE. Quantitative evaluation of histological features in "time-zero" liver allograft biopsies as predictors of rejection or graft failure: receiver-operating characteristic analysis application. *Human pathology*. 1996;27(10):1077-84.
140. Kakizoe S, Yanaga K, Starzl TE, Demetris AJ. Evaluation of protocol before transplantation and after reperfusion biopsies from human orthotopic liver allografts: considerations of preservation and early immunological injury. *Hepatology*. 1990;11(6):932-41.
141. Yabe Y, Kobayashi N, Nishihashi T, Takahashi R, Nishikawa M, Takakura Y, et al. Prevention of neutrophil-mediated hepatic ischemia/reperfusion injury by superoxide dismutase and catalase derivatives. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2001;298(3):894-9.
142. Kotzampassi K, Kalekou C, Paramythiotis D, Eleftheriadis E. Portal sinusoid's neutrophil plugging after experimental ischemia reperfusion liver injury. *Annals of Gastroenterology*. 2003;16(4):346-51.
143. Datta G, Fuller BJ, Davidson BR. Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: insights from transgenic knockout models. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2013;19(11):1683-98.
144. Fuller S. Early post-transplant resolution of liver allograft steatosis and its impact on graft survival. *Proceedings of the National Conference on Undergraduate Research (NCUR)*. 2012;Weber State University, Ogden Utah March 29-31.



145. Halazun KJ, Al-Mukhtar A, Aldouri A, Willis S, Ahmad N. Warm ischemia in transplantation: search for a consensus definition. *Transplantation proceedings*. 2007;39(5):1329-31.
146. Ploeg RJ. Strategies in preservation of abdominal organs. In: Onisco GC, Forsythe JL, Fung J, editors. *Abdominal Organ Retrieval and Transplantation Bench Surgery*. U.K.: Wiley-Blackwell; 2013. p. 9-23.
147. Selzner M, Selzner N, Jochum W, Graf R, Clavien PA. Increased ischemic injury in old mouse liver: an ATP-dependent mechanism. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2007;13(3):382-90.
148. Yoshida K, Matsui Y, Wei T, Kaibori M, Kwon AH, Yamane A, et al. A novel conception for liver preservation at a temperature just above freezing point. *The Journal of surgical research*. 1999;81(2):216-23.
149. Charrueau C, Neveux N, Chaumeil JC, Hannoun L, Cynober L, Savier E. Best temperature for static liver graft storage is 1 degrees C. *The Journal of surgical research*. 2013;180(2):322-9.
150. Laidler KJ, Peterman BF. Temperature effects in enzyme kinetics. *Methods in enzymology*. 1979;63:234-57.
151. Raison JK. The influence of temperature-induced phase changes on the kinetics of respiratory and other membrane-associated enzyme systems. *Journal of bioenergetics*. 1973;4(1):285-309.
152. Hertl M, Howard TK, Lowell JA, Shenoy S, Robert P, Harvey C, et al. Changes in liver core temperature during preservation and rewarming in human and porcine liver allografts. *Liver transplantation and surgery : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 1996;2(2):111-7.
153. Glantzounis GK, Rocks SA, Sheth H, Knight I, Salacinski HJ, Davidson BR, et al. Formation and role of plasma S-nitrosothiols in liver ischemia-reperfusion injury. *Free radical biology & medicine*. 2007;42(6):882-92.
154. Lemasters JJ, Bunzendahl H, Thurman RG. Reperfusion injury to donor livers stored for transplantation. *Liver transplantation and surgery : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 1995;1(2):124-38.
155. Pratschke S, Eder M, Heise M, Nadalin S, Pascher A, Schemmer P, et al. Protocol TOP-Study (tacrolimus organ perfusion): a prospective randomized multicenter trial to reduce ischemia reperfusion injury in transplantation of marginal liver grafts with an ex vivo tacrolimus perfusion. *Transplantation research*. 2013;2(1):3.
156. Leggett RW, Williams LR. Suggested reference values for regional blood volumes in humans. *Health physics*. 1991;60(2):139-54.
157. de la Morena G, Acosta F, Villegas M, Bento M, Sansano T, Bueno FS, et al. Ventricular function during liver reperfusion in hepatic transplantation. A transesophageal echocardiographic study. *Transplantation*. 1994;58(3):306-10.

158. Aufhauser DD, Jr., Rose T, Levine M, Barnett R, Ochroch EA, Aukburg S, et al. Cardiac arrest associated with reperfusion of the liver during transplantation: incidence and proposal for a management algorithm. *Clinical transplantation*. 2013;27(2):185-92.
159. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *The American journal of pathology*. 1994;145(6):1421-31.
160. Menger MD, Vollmar B. Role of microcirculation in transplantation. *Microcirculation*. 2000;7(5):291-306.
161. Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, Bentley RC, Clavien PA. Synergism between platelets and leukocytes in inducing endothelial cell apoptosis in the cold ischemic rat liver: a Kupffer cell-mediated injury. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2001;15(7):1230-2.
162. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2003;284(1):G15-26.
163. Sindram D, Porte RJ, Hoffman MR, Bentley RC, Clavien PA. Platelets induce sinusoidal endothelial cell apoptosis upon reperfusion of the cold ischemic rat liver. *Gastroenterology*. 2000;118(1):183-91.
164. Clavien PA, Morgan GR, Sanabria JR, Petrunka C, Levy GA, Robert P, et al. Effect of cold preservation on lymphocyte adherence in the perfused rat liver. *Transplantation*. 1991;52(3):412-7.
165. Rudiger HA, Kang KJ, Sindram D, Riehle HM, Clavien PA. Comparison of ischemic preconditioning and intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver. *Annals of surgery*. 2002;235(3):400-7.
166. El-Badry AM, Moritz W, Contaldo C, Tian Y, Graf R, Clavien PA. Prevention of reperfusion injury and microcirculatory failure in macrosteatotic mouse liver by omega-3 fatty acids. *Hepatology*. 2007;45(4):855-63.
167. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology*. 2006;43(2 Suppl 1):S31-44.
168. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology*. 1991;13(1):83-95.
169. Jaeschke H, Farhood A. Kupffer cell activation after no-flow ischemia versus hemorrhagic shock. *Free radical biology & medicine*. 2002;33(2):210-9.
170. Klune JR, Tsung A. Molecular biology of liver ischemia/reperfusion injury: established mechanisms and recent advancements. *The Surgical clinics of North America*. 2010;90(4):665-77.
171. Cursio R, Gugenheim J. Ischemia-Reperfusion Injury and Ischemic-Type Biliary Lesions following Liver Transplantation. *Journal of transplantation*. 2012;2012:164329.
172. Lewis WD, Jenkins RL. Biliary strictures after liver transplantation. *The Surgical clinics of North America*. 1994;74(4):967-78.

173. Sanchez-Urdazpal L, Gores GJ, Ward EM, Maus TP, Buckel EG, Steers JL, et al. Diagnostic features and clinical outcome of ischemic-type biliary complications after liver transplantation. *Hepatology*. 1993;17(4):605-9.
174. Guichelaar MM, Benson JT, Malinchoc M, Krom RA, Wiesner RH, Charlton MR. Risk factors for and clinical course of non-anastomotic biliary strictures after liver transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2003;3(7):885-90.
175. Paugam-Burtz C, Kavafyan J, Merckx P, Dahmani S, Sommacale D, Ramsay M, et al. Postreperfusion syndrome during liver transplantation for cirrhosis: outcome and predictors. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2009;15(5):522-9.
176. Ludwig J, Batts KP, MacCarty RL. Ischemic cholangitis in hepatic allografts. *Mayo Clinic proceedings*. 1992;67(6):519-26.
177. Cutrin JC, Cantino D, Biasi F, Chiarpotto E, Salizzoni M, Andorno E, et al. Reperfusion damage to the bile canaliculi in transplanted human liver. *Hepatology*. 1996;24(5):1053-7.
178. Corbani A, Burroughs AK. Intrahepatic cholestasis after liver transplantation. *Clinics in liver disease*. 2008;12(1):111-29, ix.
179. Lee HW, Suh KS, Shin WY, Cho EH, Yi NJ, Lee JM, et al. Classification and prognosis of intrahepatic biliary stricture after liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2007;13(12):1736-42.
180. Abt P, Crawford M, Desai N, Markmann J, Olthoff K, Shaked A. Liver transplantation from controlled non-heart-beating donors: an increased incidence of biliary complications. *Transplantation*. 2003;75(10):1659-63.
181. Nanashima A, Pillay P, Crawford M, Nakasuji M, Verran DJ, Painter D. Analysis of postrevascularization syndrome after orthotopic liver transplantation: the experience of an Australian liver transplantation center. *Journal of hepato-biliary-pancreatic surgery*. 2001;8(6):557-63.
182. Bukowicka B, Akar RA, Olszewska A, Smoter P, Krawczyk M. The occurrence of postreperfusion syndrome in orthotopic liver transplantation and its significance in terms of complications and short-term survival. *Annals of transplantation : quarterly of the Polish Transplantation Society*. 2011;16(2):26-30.
183. Chui AK, Shi L, Tanaka K, Rao AR, Wang LS, Bookallil M, et al. Postreperfusion syndrome in orthotopic liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 2000;32(7):2116-7.
184. Fukazawa K, Nishida S, Volsky A, Tzakis AG, Pretto EA, Jr. Body surface area index predicts outcome in orthotopic liver transplantation. *Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences*. 2011;18(2):216-25.
185. Pertejo MA, Torres JG, Gillem PG, Jimenez JC, Rodriguez FS, Argente GR, et al. Initial poor function in the age of old donors: prognostic factors. *Transplantation proceedings*. 2007;39(7):2109-11.



## 2. OBJECTIVOS

### 2.1. Objectivos gerais

Com o número persistentemente elevado de doentes em lista de espera para transplante hepático, tornou-se inevitável optar por estratégias de crescimento do número de enxertos disponíveis, através da adopção de critérios expandidos, incremento da transplantação sequencial com dadores com PAF e da doação de dador vivo não aparentado (1).

Dispondo assim de tipos de enxerto tão distintos, se bem que escassos, define-se a alocação correcta como um factor fundamental na obtenção de bons resultados em transplantação hepática clínica (2-4)

A diferente capacidade de resistência de cada enxerto à inevitabilidade da lesão de isquemia / reperfusão, justifica um estudo multifactorial que possa contribuir para uma alocação mais adequada, agrupando-os segundo as circunstâncias clínicas respectivas:

- relacionadas com o tipo de enxerto (cadavérico ou de dador com PAF – não sujeito ao processo de morte cerebral)
- relacionadas com o receptor (PAF ou não PAF).

Com base na prática clínica quotidiana do CHBPT / HCC, concebeu-se um protocolo de estudo com um número relevante de casos de transplante hepático, observando-se as alterações histológicas e moleculares sobre o enxerto até ao final da operação do receptor, e as suas consequências clínicas. Apesar de se reconhecer que a lesão de isquémia/reperfusão hepática decorre desde o momento inicial da reperfusão e por cerca de uma semana (5), os fenómenos moleculares com implicação na expressão do painel de genes escolhidos, foram registados logo desde o início da operação de colheita, com o intuito de validar a biopsia que antecede a LIR. As observações subsequentes abrangeram um período máximo de cerca de duas horas: esta restrição é imposta pelo próprio modelo clínico, respeitando integralmente o protocolo em vigor na Unidade de Transplantação do Hospital Curry Cabral.

Estes resultados foram, a partir de então, correlacionados com as várias evoluções clínico-laboratoriais (A, B e C), restringidas à utilização de enxertos em que se antecipou um bom funcionamento. O tipo de evolução está possivelmente relacionado com a qualidade dos enxertos e / ou com as características do receptor:

*A) - O padrão de evolução favorável, com poucos ou nenhum reinternamento, sem complicações biliares ou imunológicas, internamento mais curto e mais rápida reversão da doença e dos sintomas.*

*B) - O padrão de evolução menos favorável, mais lenta reversão da doença e dos sintomas, necessitando de terapêuticas médicas e/ou cirúrgicas pós operatórias, internamento mais prolongado e mais reinternamentos.*

*C) - O padrão de evolução desfavorável, levando à morte do receptor e/ou à necessidade de retransplante*

Visa-se obter:

- um perfil de expressão de mRNA de genes potencialmente envolvidos em mecanismos comuns de lesão celular devido à lesão de isquemia/reperfusão em aloenxertos hepáticos (Tabela I), consoante o tipo de enxerto (proveniente de cadáver ou de dador vivo PAF) e o tipo de receptor (PAF e não PAF)
- a identificação de genes cuja regulação, positiva ou negativa, possa alterar o desempenho do enxerto, se possível logo na avaliação antes da utilização (pré LIR)
- um perfil de agressão histológica nos mesmos momentos
- uma correlação entre a evolução clínica / laboratorial e as alíneas anteriores

## **2.2. Objectivos específicos**

Este trabalho pretende responder às seguintes três questões relacionadas:

*1 – A capacidade de resistência de cada enxerto à lesão de isquemia / reperfusão baseia-se mais nas suas qualidades intrínsecas ou nas características do receptor ?*

*2 – Quais as alterações moleculares (expressão dum painel de 12 genes cujos produtos estão potencialmente envolvidos na génese ou regulação de três mecanismos de lesão celular – produção de radicais livres (stress oxidativo), inflamação e apoptose) e morfológicas (histologia clássica e microscopia electrónica) verificadas em transplantação hepática clínica?*

*3 –Qual é a relevância, e eventual implicação terapêutica, dessas alterações histológicas e moleculares precoces do tecido hepático na evolução do enxerto e do seu receptor?*

## **Referências**

1. Colheita e Transplantação, Dados Preliminares. Autoridade para os Serviços de Sangue e da Transplantação, Ministério da Saúde. 2011.
2. Neuberger J, Adams D, MacMaster P, Maidment A, Speed M. Assessing priorities for allocation of donor liver grafts: survey of public and clinicians. *Bmj*. 1998;317(7152):172-5.
3. Avolio AW, Halldorson JB, Burra P, Dutkowski P, Agnes S, Clavien PA. Balancing utility and need by means of donor-to-recipient matching: a challenging problem. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2013;13(2):522-3.
4. Keller EJ, Kwo PY, Helft PR. Ethical considerations surrounding survival benefit-based liver allocation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2014;20(2):140-6.
5. Datta G, Fuller BJ, Davidson BR. Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: insights from transgenic knockout models. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2013;19(11):1683-98.





### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Introdução

Visando a avaliação da lesão hepatocelular causada pela isquémia transitória, seguida da reperfusão, estudámos:

- 1- A expressão dum painel de 12 genes (tabela I), cujos produtos estão potencialmente envolvidos na génese ou regulação de **três** mecanismos de lesão celular – **stress oxidativo** (produção de radicais livres), **inflamação** e **apoptose**.
- 2- As lesões morfológicas em todos os tipos celulares hepáticos, avaliadas por histologia clássica e por microscopia electrónica.
- 3- As implicações clínicas destas alterações moleculares e morfológicas

#### 3.2. Início do estudo

Entre 2004 e 2011 (início e final da recolha de amostras e inclusão de casos clínicos), **856 doentes** foram submetidos a transplante hepático ortotópico no Centro Hepatobiliopancreático e Transplantação do Hospital Curry Cabral.

No período temporal em que decorreu o estudo, foram incluídos **100 doentes**, 80 provenientes de dadores cadavéricos, sendo os restantes 20 provenientes de dadores vivos com PAF.

Os 80 enxertos hepáticos provenientes de dadores cadáver (todos de coração batente) foram colhidos em hospitais do território nacional, alguns das Ilhas, após os procedimentos incluídos na Lei Portuguesa (Despacho Normativo nº 700/94 de 1 de Outubro)

A inclusão de cada caso clínico dependeu da disponibilidade das equipas cirúrgicas, bem como do transporte e acondicionamento das amostras no laboratório do Centro de Histocompatibilidade da zona Sul (Lusotransplante). A disponibilidade de

reagentes utilizados também condicionou a progressão do trabalho e sua conclusão, obrigando a interrupções várias.

Os registos quanto à causa de morte, características dos dadores e hora da clampagem, foram fornecidos pelo Centro de Colheita de Órgãos e Tecidos da Zona Sul – Hospital de São José.

Apenas se disponibilizaram registos completos de 66 dadores cadavéricos (41 por doença cerebrovascular e 25 por traumatismo cranioencefálico), obrigando à exclusão de 14 casos, sobretudo em situações de alocação a nível nacional.

Os dados relativos ao transplante hepático ortotópico foram registados a partir dos arquivos do CHBPT-HCC e respectivos processos clínicos; o registo incompleto de dados referentes ao acto cirúrgico levou à exclusão de mais 5 casos (todos transplantes sequenciais).

Nos transplantes sequenciais que envolveram biópsias de enxertos provenientes de dador vivo com PAF, foi obtido o consentimento informado dos doentes dadores e da Comissão de Ética do Hospital Curry Cabral.

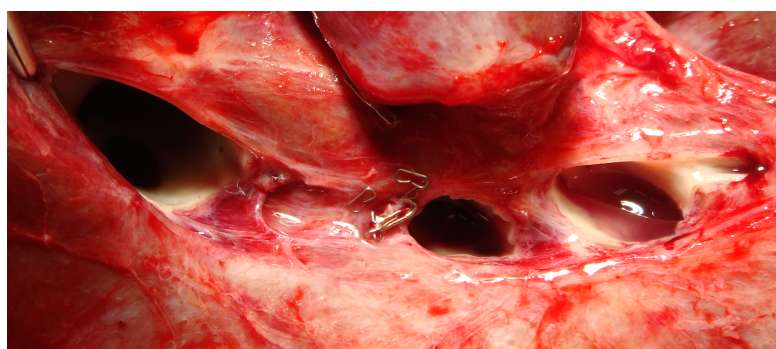
### 3.3. O Transplante Hepático

O transplante hepático ortotópico constitui uma técnica cirúrgica demorada, que engloba:

- **Uma fase prévia** de trabalho de banca (“back table”), para preparação dos pedículos do enxerto (Figura 1). No caso de transplante sequencial, foram reconstruídas as veias supra hepáticas em todos os casos: a maioria com ostium comum, nos restantes com plastia em calção, utilizando sempre enxerto venoso do dador, quer cavorenal, quer da bifurcação das veias ilíacas, como descrito na literatura (Figura 2).

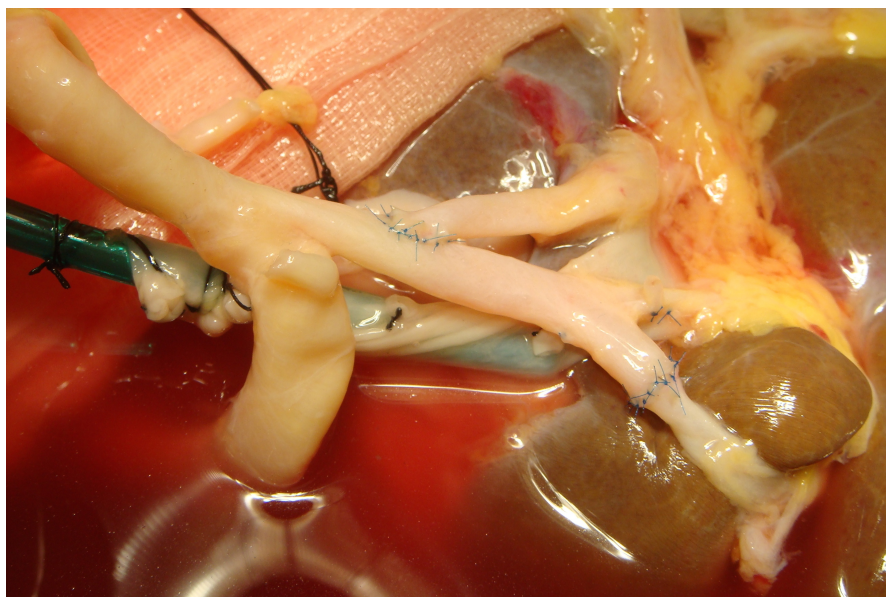


**Figura 1** – Plastia complexa das veias supra hepáticas (CHBPT-HCC).



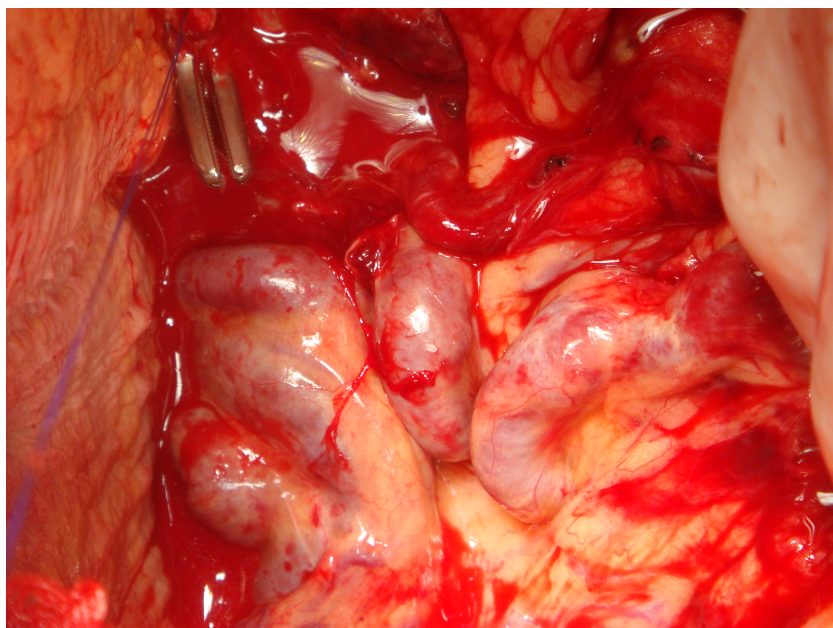
**Figura 2** – Veias supra hepáticas dum enxerto PAF antes da reconstrução (CHBPT-HCC).

Nalguns casos houve ainda necessidade de reconstrução arterial, obrigando sempre a colher com o enxerto, a bifurcação da artéria gastroduodenal. Nos casos de artérias hepáticas direitas e esquerdas substituídas, provenientes, respectivamente, da artéria mesentérica superior ou da artéria gástrica esquerda, a reconstrução arterial foi sempre feita por anastomose terminoterminal ao coto da gastroduodenal (Figura 3).

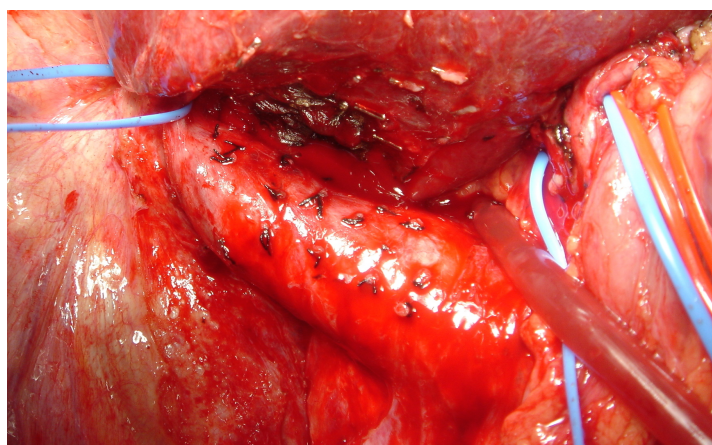


**Figura 3** – Dupla reconstrução arterial com anastomose à gastroduodenal e à esplénica (CHBPT-HCC).

- **Uma primeira fase**, a hepatectomia, com o consequente isolamento e preparação dos pedículos vasculares a anastomosar (veias supra hepáticas, veia porta e artéria hepática) e da via biliar, bem como o isolamento do fígado das suas inserções ligamentares e vasculares ao diafragma e à veia cava. Nesta fase, a presença de colateralização venosa por hipertensão portal, pode dificultar a mobilização do fígado das suas aderências posteriores (Figura 4). Em todos os casos foi utilizada a técnica denominada de “Piggyback” (1, 2), que obriga a libertar completamente o lobo caudado das suas ligações vasculares e ligamentares à veia cava (Figura 5).



**Figura 4** – Grande hipertensão portal, com colaterais venosas retroperitoneais (CHBPT-HCC).



**Figura 5** – Hepatectomia em “Piggy-Back” (CHBPT-HCC).

- **Uma segunda fase**, a fase anhepática, que decorre entre a clampagem dos pedículos vasculares e a desclampagem e consequente reperfusão. Nesta fase é implantado o enxerto hepático, sendo anastomosadas as veias supra-hepáticas e a veia porta.



- **Uma terceira fase**, pós reperfusão, em que o enxerto já está reaquecido pela circulação portal, sendo o enxerto arterializado pela anastomose da artéria hepática, seguindo-se a anastomose da via biliar.

### 3.4. Parte experimental

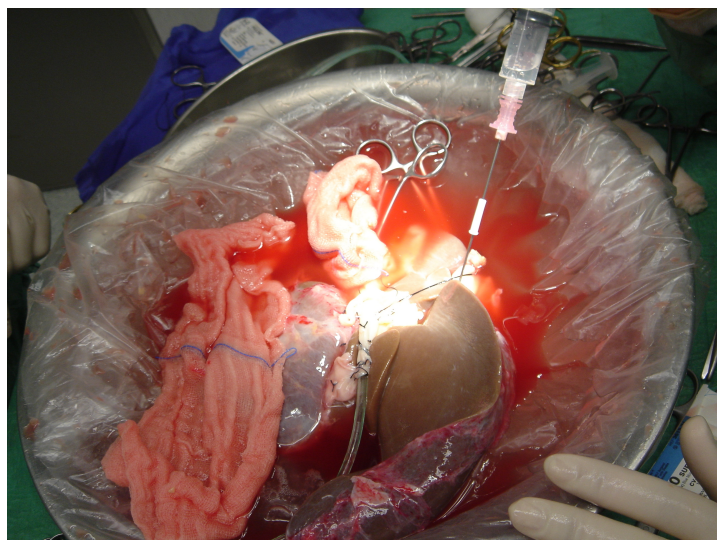
#### 3.4.1. Selecção da amostra

Foram colhidas biópsias por agulha de 100 enxertos hepáticos, 80 provenientes de cadáver com coração batente (morte cerebral) e 20 provenientes de dador vivo com PAF, em três tempos diferentes do processo de colheita e transplante hepático:

- A primeira (T0) antes da clampagem da aorta do dador
- A segunda (T1) no final da isquémia fria
- A terceira (T2) após a reperfusão, já com a circulação do receptor estabelecida sobre o enxerto durante o encerramento da parede abdominal.

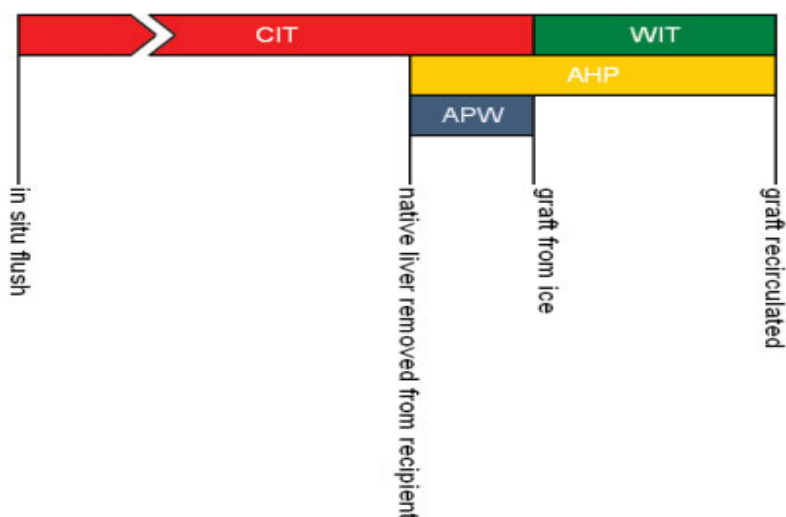
A biópsia **T0** foi obtida, em todos os casos, logo após a laparotomia do dador, antes de se proceder à dissecação cirúrgica, apenas com escassa manipulação dos órgãos e respectivos pedículos.

A biópsia **T1** foi obtida, em todos os casos, no final da isquémia fria, quando o enxerto está prestes a ser retirado do gelo (Figura 6). Designa-se por isquémia fria o tempo decorrido entre a clampagem da artéria aorta do dador (colheita em cadáver) ou a clampagem da veia porta e artéria hepática (colheita em dador vivo PAF) e a retirada do enxerto do gelo envolvente (3) (Figura 7).



**Figura 6** - Biópsia no tempo T1, final da isquemia fria (CHBPT-HCC).

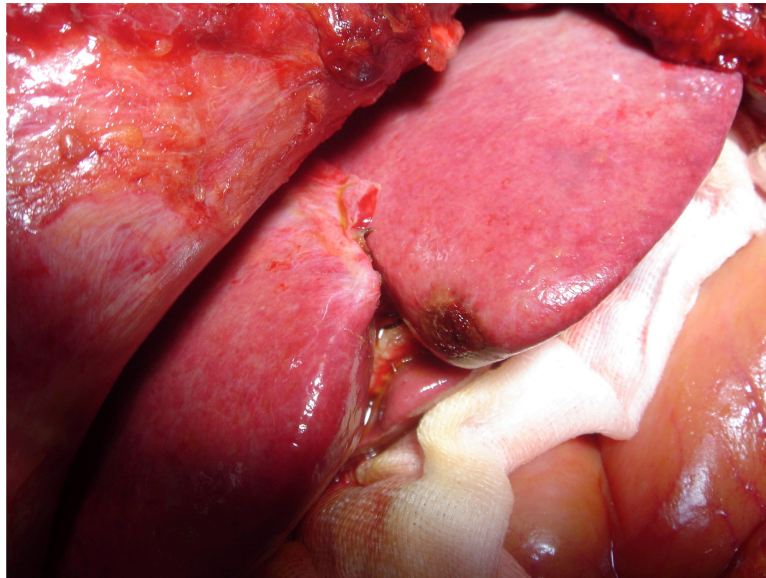
A biópsia **T2** (pós reperfusão) foi, em todos os casos, obtida cerca de pelo menos uma hora após concluída a anastomose arterial, seguindo assim o protocolo habitual de transplantação no Centro Hepatobiliopancreático e de Transplantação – CHBPT (Figura 8).



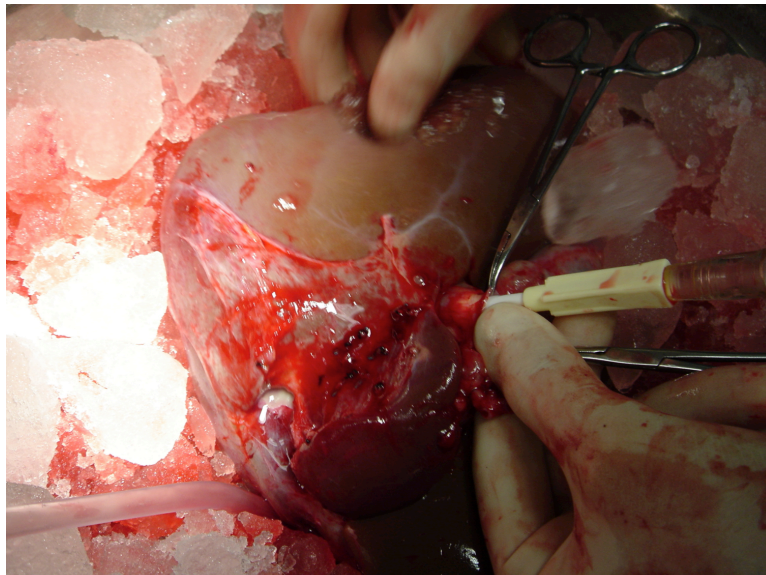
**Figure 1. Ischemia time and AHP definitions. Abbreviations: AHP, anhepatic phase; APW, anhepatic pre-warm ischemia time phase; CIT, cold ischemia time; WIT, warm ischemia time.**

**Figura 7** – Definição dos tempos de isquemia em transplantação hepática (adaptado de (3))

No caso de enxertos PAF, denominado dominó ou transplante sequencial (Figura 9 e Figura 10), a primeira biópsia (T0) foi colhida no início da hepatectomia (previamente à manipulação do fígado), sendo as amostras T1 e T2 colhidas segundo o mesmo protocolo seguido nos doadores cadavéricos.

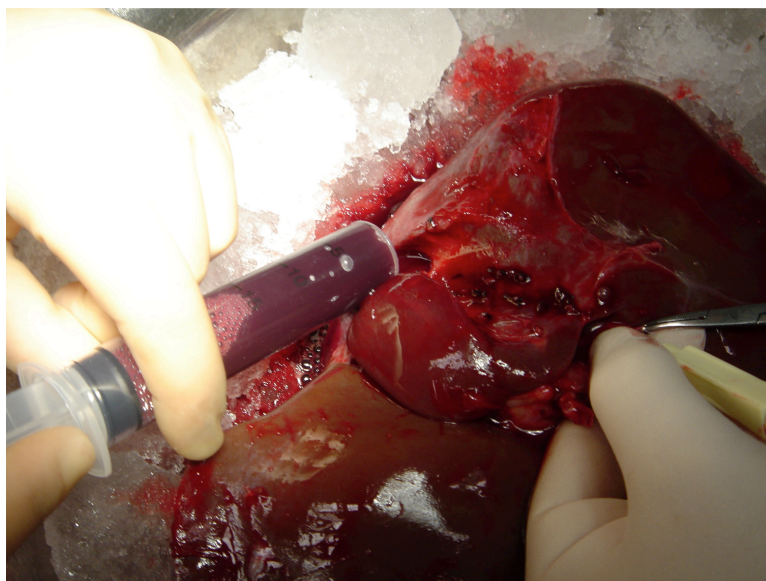


**Figura 8** – Local da biópsia pós perfusão, na extremidade do segmento III do enxerto (CHBPT-HCC).



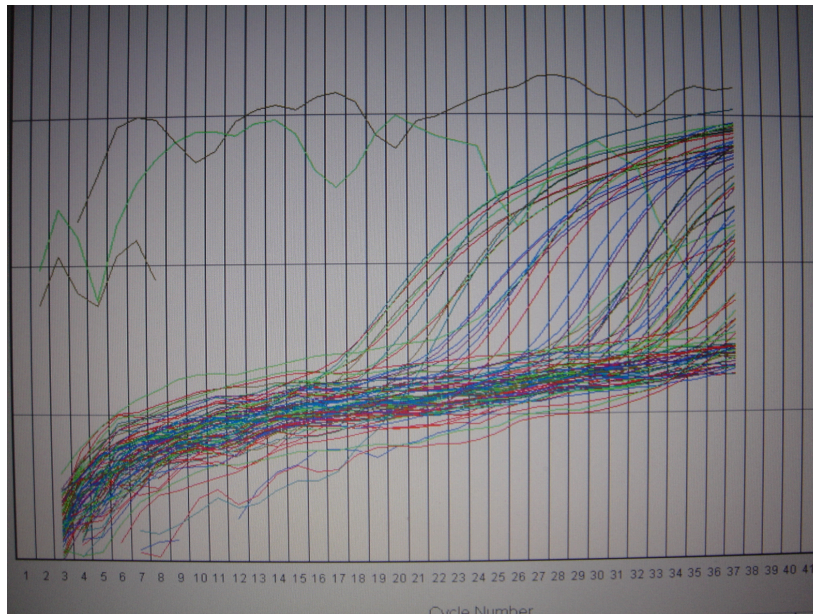
**Figura 9** – Transplante sequencial: perfusão *ex vivo* do enxerto PAF através da veia porta (CHBPT-HCC).





**Figura 10** – Transplante sequencial: aspiração de sangue intrahepático pelas veias supra hepáticas durante a perfusão portal *ex vivo* (CHBPT-HCC).

A estas amostras foi extraído RNA total, convertido em cDNA por transcrição reversa e feita a análise da expressão dos genes da CTLA4, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$ , Perforina, Selectina E (SELE), Fas-ligando, Granzima-B, Heme-Oxigenase 1 (HO1) e Óxido Nítrico Sintetase (iNOS2A) por PCR quantitativo segundo o método do Ct comparativo, utilizando como referência a expressão dos genes da amostra não-isquêmica – T0 (Figura 11). Dos 100 enxertos estudados, foram excluídas as amostras de expressão genética de 36 (30 de enxerto de cadáver e 6 de enxerto PAF), por não se ter obtido material que permitisse conclusões relevantes, ou por não incluírem as três biópsias do protocolo: foi considerado, apenas, para estudo molecular, o material proveniente dos 64 enxertos restantes.



**Figura 11** – Gráficos de conversão do RNA total em cDNA por transcrição reversa (Centro de Histocompatibilidade da Zona Sul – Lusotransplante).

Os fragmentos de todas as biópsias foram seccionados, para envio de amostra comparativa para processamento histológico habitual, sem qualquer alteração ao protocolo seguido habitualmente na Unidade de Transplantação do Hospital Curry Cabral. Foram excluídas as amostras histológicas provenientes de 33 enxertos, por não incluírem a totalidade das três biópsias do protocolo. Nas amostras dos restantes 67 enxertos foi usado um sistema de pontuação, de acordo com a gravidade das lesões avaliadas.

A presença de alguns parâmetros histológicos definidos, como esteatose, necrose, inflamação e congestão sinusoidal, foi registada e contabilizada numa classificação definida à frente.

O seguimento clínico e laboratorial, bem como o acompanhamento de eventuais complicações, foi registado e correlacionado com os dados das colheitas de órgãos e com os dados das biópsias, havendo alguns recuos superiores a 4 anos.

No total, foram considerados **54 doentes**, com registos completos clínicos e experimentais, nos quais se baseia o presente estudo.

### 3.4.2. Expressão genética

Os fragmentos de tecido foram recolhidos em recipientes contendo solução RNA later® (Ambion Life Technologies) e guardados em frigorífico (4°C), sendo enviados num prazo máximo de 48 horas, para processamento no Centro de Histocompatibilidade da Zona Sul – LusoTransplante. Sempre que possível foi usado o serviço ‘Assays-on-Demand Gene Expression Products’ da Applied Biosystems, para sintetizar o conjunto de “primers-Taqman probes” específico para cada gene em estudo, da Tabela I. Um conjunto de sondas Taqman para o chamado gene padrão ‘house-keeping’ gene ( $\beta$ -Actina) foi usado para normalização da quantificação genética. As análises de PCR cinéticas foram efectuadas no sistema de detecção de sequência Applied Biosystems ABI Prism 7900. A análise relativa de expressão genética foi efectuada pelo método ct comparativo (4).

**Tabela 1** – Pannel de genes escolhidos e correspondentes proteínas

Gene	Proteína	Ref. Ecomenda Applied	Ref. Seq.
IL-1 $\beta$	Citoquina proinflamatória	Hs00174097_m1	NM_000576
IL-4	Citoquina anti-inflamatória	Hs00174122_m1	NM_000589
IL-6	Citoquina inflamatória	Hs00174131_m1	NM_000600
IL-13	Citoquina anti-inflamatória	Hs00174379_m1	NM-002188
TNF- $\alpha$	Citoquina pró-inflamatória	Hs00174128_m1	NM_000594
Perforina	Proteína citolítica	Hs00169473_m1	NM_005041
CTLA 4	Proteína inibidora de sinal para as cél. T		NM_001037631
Selectina E	Molécula de adesão leucocito-endotelial	Hs00174057_m1	NM_002089
Fas-L	Ligando do receptor Fas	Hs00181225_m1	NM_000639
Granzima B	Activador da Protease das Caspases	Hs00188051_m1	NM_004131

iNOS	Óxido nítrico sintetase indusível	Hs00167248_mi	NM_000625
HO1	Heme Oxigenase 1 induzível	Hs00157965_m1	NM_002133
Hu ACT B	Housekeeping gene	PN 4333762F	NM_001101.2

---

#### 3.4.2.1. Painel de genes escolhidos

Foi seguida a expressão dos genes que em seguida se descrevem:

- **CTLA-4 (Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4)**

**Comentário:** *A análise da expressão deste gene foi descontinuada a partir do caso 28 uma vez se revelou quase sempre sem resultados significativos.*

- **INTERLEUCINA 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ )**

**Comentário:** *Obtiveram-se registos significativos em todos os casos.*

- **TNF- $\alpha$**

**Comentário:** *Registos significativos em todos os casos.*

- **INTERLEUCINA 13 (IL13)**

**Comentário:** *Quase sempre sem resultados significativos, a sua análise foi descontinuada nos casos 23 a 32 (10 casos). Apenas em 20 casos há resultados comparativos.*

- **INTERLEUCINA 4**

**Comentário:** *Descontinuada a partir do caso 22 por não haver expressão.*

- **INTERLEUCINA 6**

**Comentário:** *Obtiveram-se registos significativos em praticamente todos os casos.*

- **PERFORINA**

**Comentário:** *Só foi analisada a partir do caso 19, em substituição doutros genes que foram descontinuados, como a IL 4.*

- **GRANZIMA B**

**Comentário:** *Obtiveram-se registos significativos em todos os casos.*

- **SELECTINA E (SELE)**

**Comentário:** *Obtiveram-se registos significativos em todos os casos.*

- **FASLIGANDO (FAS-L)**

**Comentário:** *Obtiveram-se registos significativos em todos os casos.*

- **ÓXIDO NÍTRICO SINTETASE INDUZIDA (iNOS)**

**Comentário:** *Obtiveram-se registos significativos em todos os casos.*

- **HEME OXIGENASE 1 INDUZIDA (HO1)**

**Comentário:** *Obtiveram-se registos significativos em todos os casos.*

### **3.4.3. Anatomia Patológica**

A extensão da lesão hepática causada pela isquémia de reperfusão foi avaliada histologicamente, pela **classificação de Susuki** (5) segundo a qual se avaliam 3 parâmetros histológicos, congestão sinusoidal, balonização e necrose, cada uma delas graduada de 0 a 4 (Quadro 1).

**Quadro 1** – Classificação de da lesão de isquemia/reperfusão

Pontuação	Congestão sinusoidal	Vacuolização / Balonização	Necrose
0	ausente	ausente	ausente
1	mínima	mínima	célula isolada
2	suave	suave	< 30%
3	moderada	moderada	30 % - 60 %
4	grave	grave	> 60 %

Para além dos três parâmetros histológicos que integram a classificação de Suzuki, outros dois foram incluídos, por serem considerados fundamentais na avaliação da lesão de isquemia/reperfusão: a **infiltração neutrofílica** e o grau de **esteatose**

Foi considerada tanto a macro como a microesteatose, tendo em conta que, sobretudo a macroesteatose induz uma amplificação mais relevante na lesão de I/R, podendo induzir fenómenos de entupimento mecânico na microcirculação hepática (lipopeliose).

**Análise histológica** - Foram incluídas neste estudo três biopsias de cada um dos 54 enxertos. Em todas as biopsias obtidas, foi enviado um fragmento , que foi incluído em parafina, segundo o protocolo habitual, tendo sido obtidos cortes histológicos que foram corados por HE (hematoxilina/eosina). Em cada um deles foram quantificados os parâmetros definidos pela Classificação de Suzuki (5). Ao sistema de pontuação da Classificação de Suzuki, foi acrescentada a pontuação de mais dois parâmetros mencionados acima (esteatose e infiltração neutrofílica), obtendo assim uma pontuação final, consistindo na soma das pontuações parciais.

**Quadro 2** – Pontuação de acordo com a lesão histológica (Suzuki, esteatose e infiltração por neutrófilos)

Pontuação	Esteatose	Infiltração por neutrófilos	Congestão sinusoidal	Vacuolização/ Balonização	Necrose
0	ausente	Raros e dispersos	ausente	ausente	ausente
1	ligeira (<30%)	5 HPF (*)	mínima	mínima	célula isolada
2	moderada (>30%<60%)	>30<60	suave	suave	< 30%
3	Intensa (>60%)	n/a	moderada	moderada	30 % - 60 %
4	n/a	n/a	grave	grave	> 60 %

(\*) – High Power Field; n/a, não aplicável

#### 3.4.4. Microscopia Electrónica

Foram incluídas neste estudo duas biópsias (T1 e T2) de alguns enxertos em que o material obtido permitiu a divisão num terceiro segmento, sem prejuízo dos restantes. As amostras foram fixadas em gluteraldeído a 3% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,3, e enviadas para processamento e estudo no microscópio electrónico de transmissão do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Curry Cabral (JEOL 100SX).

Processamento para microscopia electrónica de transmissão: após fixação primária no fixador indicado acima durante 2h as amostras foram lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,3 e fixadas secundariamente durante 1h em tetróxido de ósmio a 1% no mesmo tampão. As amostras foram lavadas em tampão acetato-ácido acético 0,1M pH 5, e fixadas adicionalmente em acetato de uranilo a 0.5% no

mesmo tampão durante 1h. Após lavagem no mesmo tampão, a desidratação foi feita em concentrações crescentes de etanol. Após passagem em óxido de propileno, as amostras foram incluídas numa mistura de Epom e Araldite.

Os cortes finos para observação ao microscópio foram feitos com faca de diamante e contrastados com acetato de uranilo em solução aquosa a 2% e citrato de chumbo.

Estas amostras visaram apenas a documentação e confirmação de alguns aspectos morfológicos ultraestructurais descritos na lesão de isquémia / reperfusão (6).

### 3.5. Parte clínica

#### 3.5.1. Dadores

Foram incluídos **54** enxertos, 42 de cadáver e 12 enxertos de dador vivo com PAF.

Não houve registo específico de quaisquer intercorrências dignas de nota, em todos os procedimentos de doação. A operação de colheita cadavérica foi efectuada, em todos os casos, por equipas cirúrgicas experientes, pertencentes aos quatro Centros de colheitas de órgãos nacionais, utilizando a técnica rápida de Starzl (7) com a solução de preservação habitual (Celsior, Sangstat, Lyon, França), segundo o protocolo do CHBPT – HCC e do Centro de Colheita do Centro Hospitalar de Lisboa Central (Tabela 2).

A operação de colheita em dador vivo com PAF foi efectuada, em todos os casos, no CHBPT-HCC, pela mesma equipa cirúrgica, segundo a técnica de duplo Piggyback (8) sem intercorrências e sem suporte transfusional, registando-se o tempo até à clampagem da veia porta e artéria hepática.

Relativamente ao processo de colheita em cadáver, registaram-se os seguintes dados clínicos: idade do dador, sexo, raça, causa de morte, grupo sanguíneo, tempo de ventilação, hospital de proveniência do enxerto e hora de clampagem da aorta. Análises sanguíneas: hemograma, ureia, glicemia, creatinina, ionograma, AST, ALT,



bilirrubinas, fosfatase alcalina, gama glutamil transpeptidase, desidrogenase láctica, tempo de protrombina e aPTT.

O tempo de isquémia fria foi determinado, em todos os 54 casos, segundo a definição acima descrita (3).

O aspecto macroscópico do enxerto foi o factor mais importante na decisão da aceitação para transplante, tendo-se efectuado, pontualmente, uma biópsia hepática, em cunha ou por agulha, sempre que o cirurgião da equipa de colheita assim o decidiu.

As características do dador, clínicas, laboratoriais analíticas e serológicas e imagiológicas foram fornecidas e analisadas em tempo útil, antes do início da colheita multiorgânica.

**Tabela 2** – Composição dos solutos de preservação Celsior e UW

	<b>Celsior®</b>	<b>UW®</b>
Hidroxil-etil-amido (g/L)		50
Rafinose (mmol/L)		30
Manitol (mmol/L)	60	
Lactobionato (mmol/L)	80	100
Glutamato (mmol/L)	20	
Glutathione (mmol/L)	3	
Alopurinol (mmol/L)	1	
Adenosina (mmol/L)		5
Histidina (mmol/L)	30	
Fosfato de Potássio (mmol/L)		25
Sulfato de Magnésio (mmol/L)		4,8
Cloreto de Potássio (mmol/L)	15	
Cloreto de Cálcio (mmol/L)	0,25	
Cloreto de Magnésio (mmol/L)	13	
Hidróxido de Sódio (mmol/L)	100	
Hidróxido de Potássio (mmol/L)		100
Osmolaridade (mOsm/kg)	320	320

### 3.5.2. Receptores

Foram registadas as seguintes variáveis gerais, referentes aos doentes incluídos no estudo: idade, sexo, diagnóstico principal e grupo sanguíneo. Em todos os casos avaliou-se a pontuação relativa à escala de sobrevida pós transplante hepático (“Survival Outcomes Following Liver Transplantation” – SOFT), e Balanço de Risco – BAR – [www.barscore.org](http://www.barscore.org).

Nos casos de doença hepática crónica, foram avaliadas as pontuações relativas ao MELD (Model for End Stage Liver Disease) e à classificação de Child Pugh.

Dados do receptor: sexo, idade, diagnóstico, MELD, raça, grupo sanguíneo, transplante urgente / electivo, análises sanguíneas: hemograma, ureia, creatinina, ionograma, AST, ALT, bilirrubinas, fosfatase alcalina, gama glutamil transpeptidase, desidrogenase láctica, tempo de protrombina e aPTT.

Separaram-se os receptores de enxerto de cadáver de acordo com a sua alocação, porque os receptores com PAF são habitualmente transplantados com enxertos de dadores mais jovens. Por outro lado, a ocorrência de lesão de I/R pode ser expressada de maneira diferente, consoante as características do receptor.

Os doentes foram então divididos nos seguintes grupos:

- **Grupo 1** : Dador cadáver para receptor cirrótico.
- **Grupo 2** : Dador cadáver para receptor PAF.
- **Grupo 3** : Dador PAF para receptor cirrótico.

### 3.5.3. Transplante Hepático

Os dados relativos ao transplante hepático ortotópico foram:

- tempo de isquémia fria - determinado, em todos os 54 casos, segundo a definição acima descrita (3).

- tempo de isquémia quente - definido pelo tempo decorrido entre a retirada do enxerto do gelo até à reperfusão pela desclampagem da veia porta: isquémia quente no receptor ou segunda isquémia quente (9). Neste período, existe um inevitável aquecimento do enxerto, pela necessidade da sua manipulação e lavagem com soros destinados à diluição e escoamento do soluto de preservação, que permanece na rede vascular intrahepática. O protocolo em vigor na nossa Unidade de Transplantação, inclui 1000 a 2000 cc de Plasma-Lyte®, (solução cristalóide de electrólitos, pH – 7.4, a cerca de 10°C , Baxter Médico-Farmacêutica, Lda., Portugal), que é infundido por declive continuamente pela veia porta do enxerto até à conclusão da anastomose das veias suprahepáticas, mesmo nos transplantes sequenciais.

- tempo de cirurgia
- número de unidades de concentrado eritrocitário
- número de unidades de plasma fresco congelado.

Em todos os casos foi utilizada a técnica de hepatectomia com preservação da veia cava (“Piggy back” (2)).

Foram incluídas as variáveis estabilidade / instabilidade hemodinâmica, quantidade de sangue processada no cell saver, número de unidades transfundidas de hemoderivados além dos concentrados eritrocitários (plaquetas, plasma fresco congelado, fibrinogénio, factor VII recombinante), duração da preparação do enxerto na banca, colocação de tubo em T, tipo de transplante (simples ou sequencial, urgente / electivo, primeiro ou retransplante), tipo de enxerto (cadavérico ou vivo – de PAF).

#### **3.5.4. Dados clínicos e laboratoriais do seguimento do receptor**

Dias de U.C.I., SOFA dos 3 primeiros dias de unidade, data da última notícia, número de reinternamentos, episódios de rejeições, recidivas virais, reintervenções no primeiro ou outros internamentos, complicações cirúrgicas, complicações

infecciosas, mortalidade e dias de internamento. As complicações foram catalogadas segundo a classificação de Dindo – Clavien, descritas no Quadro 3 e Quadro 4.

### **Quadro 3** - Classificação de Clavien das complicações perioperatórias

---

**Grau 1.** *Qualquer alteração ao pós-operatório ideal sem comprometer a recuperação total, facilmente controlável. Inclui: a) sem perigo para a vida, b) requerem drogas, tais como imunossuppressores, analgésicos, antipiréticos, anti-inflamatórios e antieméticos, diuréticos, hipotensores, medicação para dislipidémia ou hiperglicémia transitória, c) requerem procedimentos terapêuticos que podem ser efectuados à cabeceira, d) hemorragia pós operatória a necessitar de menos de 3 UCE, e) nunca associada a estadia na UCI superior a 5 dias ou hospitalar superior a 4 semanas.*

Exemplos:

- Infecções superficiais da ferida cirúrgica não tratadas com antibióticos
- Fuga biliar tratada conservadoramente
- Rejeição tratada apenas com aumento da imunossupressão
- Aumento da creatinina sérica superior a 2 vezes relativamente aos valores pré-transplante ou aumento superiores a 1,5dr/dl e que resolvem numa semana
- Hiperglicémia superior a 200mg/dl que resolve o espaço de uma semana
- Hipertensão arterial bem controlada
- Hiperlipidémia, com colesterol total superior a 240mg/dl, ou LDL > 160mg/dl, que normaliza ao fim de 3 meses de tratamento

**Grau 2.** *Qualquer complicação que pode por a vida em risco, que resulta numa estadia na UCI > 5 dias ou no hospital > 4 semanas, mas da qual não resulta qualquer lesão permanente.*

**Grau 2a** *Complicação que necessita apenas do uso de fármacos ou hemorragia a necessitar de mais que 3 UCE*

Exemplos:

- Rejeição que necessita de imunossuppressores habitualmente não utilizados
- Aumento transitório da creatinina sérica para valores acima do referido anteriormente ou que não resolve no espaço de 1 semana
- Infecção bacteriana, viral ou fúngica, com necessidade de terapia específica
- Disfunção primária do enxerto: AST à entrada > 2000 U, ou aumento de

transitório de AST > 1000 U ou TP persistentemente baixa (<2) durante mais de 3 dias

- Aumento do IMC > 30 kg/m<sup>2</sup> ou aumento em 5kg/m<sup>2</sup> em doentes obesos pré operativamente ou caquexia com IMC < 18kg/m<sup>2</sup> ou diminuição em 2kg/m<sup>2</sup> em doentes já caquéticos pré operativamente
- Dislipidémia de acordo com o definido antes a requerer mais de 3 meses de terapêutica para normalização
- Diabetes mellitus transitória a necessitar de hipoglicemiantes durante mais de 7 dias

**Grau 2b** *Complicações que necessitam de intervenções invasivas, readmissões na UCI ou prolongamento da estadia na UCI por mais de 5 dias, mas que não conduzem a danos residuais*

Exemplos:

- Disfunção primária do enxerto a necessitar de permanecer na UCI mais de 5 dias
- Hemorragia pos operatória a necessitar de relaparotomia
- Hemorragia gastrointestinal tratada cirurgicamente ou por via endoscópica
- Leak biliar a necessitar de tratamento endoscópico ou cirúrgico
- Estenose biliar a necessitar de correcção cirúrgica, endoscópica ou percutânea
- Lesão renal aguda a necessitar de diálise
- Tumores cutâneos, basocelular ou de células escamosas

**Grau 3** *Qualquer complicação que conduza a incapacidade residual ou desenvolvimento de doença maligna (excepto os tumores cutâneos já referidos)*

**Grau 3a** *Complicação com incapacidade residual sem indícios de progressão, com baixo risco de conduzir a disfunção de enxerto ou morte*

Exemplos

- Hepatite C de novo
- Rejeição crónica não progressiva
- Estenose biliar persistente, não passível de ser corrigida por via cirúrgica ou endoscópica, sem evidência de falência hepática ou colangite
- Elevação persistente (> 6 meses) da creatinina, como definida acima
- Paragem cardíaca ou Enfarte do miocárdio sem incapacidade significativa (classe de New York I-II)
- Obesidade mórbida ou caquexia persistente (> 6 meses) como definida anteriormente
- Diabetes mellitus persistente (> 6 meses) com HgA1c > 7gr/dl

Dislipidemia não corrigida ao fim de 6 meses de tratamento

**Grau 3b** *Complicações com incapacidade duradoura que são de difícil controle e que apresentam risco significativo de disfunção de enxerto ou morte*

Exemplos

- Hepatite B de novo
- Desenvolvimento de neoplasia
- Estenose biliar persistente não corrigida com tratamento cirúrgico ou endoscópico e que condiciona progressão para falência hepática ou colangite recorrente
- Insuficiência renal requerendo hemodiálise por um período > 6 meses

Paragem cardíaca ou enfarte do miocárdio resultando em incapacidade funcional significativa (classe de New York III-IV)

**Grau 4** Complicações que resultam em retransplante (4a) ou morte (4b)

---

#### **Quadro 4 - Classificação de Clavien das complicações perioperatórias (simplificada)**

<b>Grau 1</b>	Qualquer desvio do normal pós-operatório sem lugar a tratamento farmacológico ou intervenção cirúrgica, endoscópica ou de radiologia de intervenção. Regimes terapêuticos permitidos: antieméticos, antipiréticos, analgésicos, diuréticos, electrolitos e fisioterapia. Inclui infecção da ferida operatória se drenada na enfermaria.
<b>Grau 2</b>	Necessidade de tratamento farmacológico com fármacos não incluídos em 1. Transfusões e nutrição parentérica incluídas.
<b>Grau 3a</b>	Necessidade de tratamento cirúrgico, endoscópico ou de radiologia de intervenção sem anestesia geral.
<b>Grau 3b</b>	Necessidade de tratamento cirúrgico, endoscópico ou de radiologia de intervenção com anestesia geral.
<b>Grau 4a</b>	Complicação com perigo de vida (incluindo sistema nervoso central) com necessidade de internamento em unidade de cuidados intensivos com falência de um órgão (inclui diálise).
<b>Grau 4b</b>	Complicação com perigo de vida (incluindo sistema nervoso central) com necessidade de internamento em unidade de cuidados intensivos com falência multi-orgânica
<b>Grau 5</b>	Morte do doente

---

A **disfunção de enxerto** baseou-se na verificação de pelo menos um dos três critérios seguintes:

- **Classificação de Howard**: defeito de preservação, que consiste em AST > 2000 U no primeiro dia de pós-operatório (10).

- **Crítérios de Ploeg-Maring** : disfunção inicial, AST > 2000 U e TP < 1,5 entre o dia 2 e 7; disfunção primária (primary non-function): morte ou retransplante entre os dias 1 e 7 (11, 12).

- **E.A.D. - Early Allograft Dysfunction** – Critérios de definição de disfunção precoce do aloenxerto, validados na era do MELD (Model for End-Stage Liver Disease) (13): uma, ou mais, das seguintes

Bilirrubina total >10 mg/dl no 7º dia de pós operatório

INR superior ou igual a 1.6 no 7º dia de pós operatório

Transaminases (AST ou ALT) >2000 UI/ml nos primeiros 7 dias de pós operatório

### 3.5.5. Variáveis resposta pós transplante hepático

Com os progressos verificados na imunossupressão e consequente melhoria dos resultados a longo prazo, redefiniram-se características clínico-laboratoriais relacionadas com os prognósticos (14).

Foram consideradas as seguintes variáveis, como as mais relevantes e objectivas para a interpretação da evolução clínica, tendo sido comparadas estatisticamente com os dados recolhidos, laboratoriais e clínicos:

**1- DISFUNÇÃO DO ENXERTO**: decisivo na definição do subgrupo de enxertos com expressão clínica subóptima, também referida como “fenótipo clínico”, com implicações directas sobre a sobrevida do enxerto e do receptor (13).

**2 – COMPLICAÇÕES PÓS OPERATÓRIAS:** se bem que incluam situações clínicas com implicações muito diferentes no médio e no longo prazo, registaram-se como variável resposta a partir do grau 2 – classificação de Dindo – Clavien (15, 16).

**3 – NÚMERO DE REINTERNAMENTOS IGUAL OU SUPERIOR A 2:** pelo número de reinternamentos pode-se aferir a qualidade do resultado do transplante a longo prazo, sendo esta variável incluída, sempre que se faz um estudo comparativo entre populações diferentes de doentes transplantados (17).

**4 – REJEIÇÃO CRÓNICA / MORTE DO RECEPTOR:** a falência do enxerto, com necessidade de retransplante ou evolução para a morte do receptor, é considerada uma variável fundamental na avaliação dos resultados a longo prazo (18).

### 3.6. Análise estatística

Foi efectuada uma análise descritiva dos dados. As variáveis categóricas foram descritas através de frequências/percentagens e as variáveis contínuas foram descritas através da média (desvio padrão) ou através da mediana e da amplitude interquartil ( $P_{25} - P_{75}$ ), conforme adequado. Na análise univariável foram utilizados os testes não paramétricos Qui-Quadrado/exacto de Fisher e ainda os testes de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis devido à existência de observações extremas (*ouliers*) e à grande variabilidade e assimetria dos dados.

Para avaliar os factores associados a maior risco de disfunção do enxerto, de complicações Dindo-Clavien e de ter 2 ou mais reinternamentos, utilizaram-se modelos de regressão logística multivariável, tendo sido calculadas as razões de possibilidades (Odds Ratio - OR).

No estudo de análise de sobrevivência do tempo até à morte do receptor ou rejeição crónica do enxerto foram utilizados métodos de análise de sobrevivência (estimador não paramétrico de Kaplan-Meier e modelo de regressão de Cox).



Tanto para os modelos de regressão logística como para o modelo de regressão de Cox foram seleccionadas para os modelos múltiplos todas as variáveis que atingiram um valor  $p < 0.25$  na análise univariável.

O nível de significância considerado foi  $\alpha = 0,05$  tendo sido calculados os intervalos de confiança (IC95) sempre que apropriado. A análise de dados foi efectuada utilizando o *software* Statistical Package for the Social Sciences for Windows version 22.0 (SPSS Inc, Chicago IL, USA).

## Referências

1. Calne RY, Williams R. Liver transplantation in man. I. Observations on technique and organization in five cases. *British medical journal*. 1968;4(5630):535-40.
2. Tzakis A, Todo S, Starzl TE. Orthotopic liver transplantation with preservation of the inferior vena cava. *Annals of surgery*. 1989;210(5):649-52.
3. Ijtsma AJ, van der Hilst CS, de Boer MT, de Jong KP, Peeters PM, Porte RJ, et al. The clinical relevance of the anhepatic phase during liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2009;15(9):1050-5.
4. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-8.
5. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation*. 1993;55(6):1265-72.
6. Iancu TC, Manov I. Electron Microscopy of Liver Biopsies. In: Takahashi H, editor. *Liver Biopsy: InTech*; 2011.
7. Starzl TE, Miller C, Broznick B, Makowka L. An improved technique for multiple organ harvesting. *Surgery, gynecology & obstetrics*. 1987;165(4):343-8.
8. Pena JR, Barroso E, Martins A, Andrade JR, Pereira JP. Sequential whole liver transplant resected as piggyback from FAP patients. *Liver Transplantation*. 2002;8:24.
9. Halazun KJ, Al-Mukhtar A, Aldouri A, Willis S, Ahmad N. Warm ischemia in transplantation: search for a consensus definition. *Transplantation proceedings*. 2007;39(5):1329-31.
10. Howard TK, Klintmalm GB, Cofer JB, Husberg BS, Goldstein RM, Gonwa TA. The influence of preservation injury on rejection in the hepatic transplant recipient. *Transplantation*. 1990;49(1):103-7.

11. Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM, et al. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation--a multivariate analysis. *Transplantation*. 1993;55(4):807-13.
12. Maring JK, Klompmaker IJ, Zwaveling JH, Kranenburg K, Ten Vergert EM, Slooff MJ. Poor initial graft function after orthotopic liver transplantation: can it be predicted and does it affect outcome? An analysis of 125 adult primary transplantations. *Clinical transplantation*. 1997;11(5 Pt 1):373-9.
13. Olthoff KM, Kulik L, Samstein B, Kaminski M, Abecassis M, Emond J, et al. Validation of a current definition of early allograft dysfunction in liver transplant recipients and analysis of risk factors. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2010;16(8):943-9.
14. Washburn K. Endpoints in trials for clinical liver transplantation. *Current opinion in organ transplantation*. 2008;13(3):252-6.
15. Dindo D, Demartines N, Clavien PA. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Annals of surgery*. 2004;240(2):205-13.
16. Clavien PA, Barkun J, de Oliveira ML, Vauthey JN, Dindo D, Schulick RD, et al. The Clavien-Dindo classification of surgical complications: five-year experience. *Annals of surgery*. 2009;250(2):187-96.
17. Aduen JF, Sujay B, Dickson RC, Heckman MG, Hewitt WR, Stapelfeldt WH, et al. Outcomes after liver transplant in patients aged 70 years or older compared with those younger than 60 years. *Mayo Clinic Proc*. 2004;84(11):973-8.
18. Charlton MR, Burns JM, Pedersen RA, Watt KD, Heimbach JK, Dierkhising RA. Frequency and outcomes of liver transplantation for nonalcoholic steatohepatitis in the United States. *Gastroenterology*. 2011;141(4):1249-53.

## 4. RESULTADOS EXPERIMENTAIS

### 4.1. Resultados gerais

Foram incluídos, por patologias, 15 doentes com PAF, 37 doentes com doença hepática crónica (dos quais 9 com carcinoma hepatocelular – CHC) e 2 com doença hepática aguda.

As etiologias de doença hepática crónica incluíram cirrose a vírus C, cirrose etanólica, cirrose biliar primária, doença de Wilson, adenomatose difusa, colangite esclerosante, cirrose autoimune e hemocromatose.

Em 4 casos, tratou-se de retransplante.

Em 24 casos, tratou-se de transplante sequencial, sendo 12 dadores e 12 receptores de enxerto PAF.

Separaram-se os receptores de enxerto de cadáver de acordo com a sua alocação, porque os receptores com PAF são habitualmente transplantados com enxertos de dadores mais jovens. Por outro lado, a ocorrência de lesão de I/R pode ser expressada de maneira diferente, consoante as características do receptor.

Os doentes foram então divididos nos seguintes grupos:

- **Grupo 1** (n=27): Dador cadáver para receptor cirrótico
- **Grupo 2** (n=15): Dador cadáver para receptor PAF
- **Grupo 3** (n=12): Dador PAF para receptor cirrótico

A caracterização geral dos doentes está apresentada na Tabela 4.

**Tabela 4** - Características dos doentes (n=54)

Parâmetros	Resultados
Idade mediana (SD)	45 (14)
Sexo Masc. (n e %)	42 (78%)
Grupo Sanguíneo (n e %)	
A	28 (52%)
B	3 (6%)
AB	3 (6%)
O	20 (37%)
MELD mediana (SD) (n=36)	16 (8)
CTP class. (n e %)	
A	20 (55%)
B	10 (27%)
C	6 (18%)
Doença Principal (n e %):	
PAF	15 (27%)
HCV	16 (29%)
Cirrose alcoólica	14 (25%)
Doença biliar	4 (7%)
Doença autoimune	2 (3%)
Doença metabólica	4 (7%)
Falência hepática aguda	3 (5%)
SOFT (n e %)	
Baixo Risco	37 (69%)
Risco Baixo-Moderado	12 (22%)
Risco Alto-Moderado	5 (9%)

MELD (Model for End Stage Liver Disease), CPT (Child-Turcotte-Pugh), PAF (Paramiloidose Familiar), HCV (Hepatitis C Virus), SOFT (Survival Outcomes Following Liver Transplantation)

O Quadro 1 apresenta as informações relativas aos dados analíticos, divididos pelos 3 grupos considerados em relação à alocação. Algumas diferenças podem ser apreciadas. A idade do dador é mais alta no Grupo 2, mas não difere significativamente entre os grupos ( $p=0.655$ ), tal como o consumo intraoperatório de Unidades de Concentrado Eritrocitário (UCE) no Grupo 1 ( $p=0.087$ ). O consumo intra operatório de Unidades de Plasma Fresco Congelado (PFC) revelou uma diferença estatisticamente significativa entre o Grupo 1 e o Grupo 3 ( $p=0.013$ ). Apesar do tempo de isquémia fria ter sido superior no Grupo 2, não alcançou significado estatístico ( $p=0.715$ ). Para além disso, o nível máximo de

aminotransferases, um marcador comum de insulto hepático, não revelou diferenças significativas entre os grupos ( $p=0.067$  e  $p=0.087$ ).

**Quadro 1** - Dados analíticos (mediana dos parâmetros) para cada grupo considerado

Parâmetro	Grupo 1 (n=27)	Grupo 2 (n=15)	Grupo 3 (n=12)	Valor de P
Pico ALT ( $P_{25}$ - $P_{75}$ ) (I.U./L)	679 (480-1079)	707 (583-1831)	397 (362-535)	0.067
Pico AST ( $P_{25}$ - $P_{75}$ ) (I.U./L)	599 (260-1163)	892 (504-1731)	403 (206-920)	0.087
Idade do dador ( $P_{25}$ - $P_{75}$ )	34 (25-44)	40 (26-57)	31 (28-35)	0.655
Tempo de Isquemia fria ( $P_{25}$ - $P_{75}$ ) (minutos)	441 (360-579)	470 (390-595)	440 (355-533)	0.715
UCE ( $P_{25}$ - $P_{75}$ )	10 (5-13)	6 (3-7)	6 (3-10)	0.087
PFC ( $P_{25}$ - $P_{75}$ )	25 (19-40)	19 (12-28)	15 (12-22)	<b>0.035*</b>

UCE (unidades de concentrado eritrocitário); PFC (unidades de plasma fresco congelado)

\* Grupo 1 vs Grupo 3,  $p=0.013$

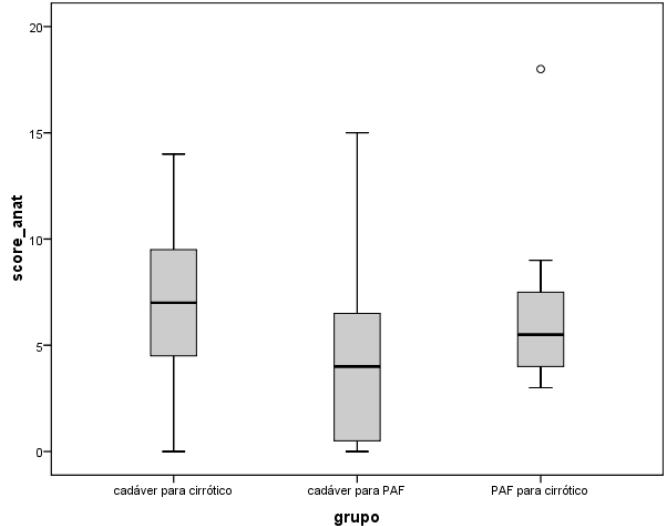
## 4.2. Resultados anatomopatológicos

As biopsias obtidas para os 54 enxertos revelaram as diferenças histológicas objectivadas pela classificação de Suzuki acrescida de dois outros parâmetros (esteatose e infiltração neutrofílica) o que permitiu numerar, por pontuação, os resultados para cada caso. A pontuação histológica variou entre 0 e um máximo de 18.

**Infiltração neutrofílica:** observou-se evidência de infiltração menor no Grupo 3 (enxerto PAF para receptor cirrótico) na amostra T0 ( $p=0.082$ ).

Também se observou que a expressão genética da HO1 nas biopsias T2 está associada à infiltração neutrofílica ( $p=0.022$ ). Nenhuma das outras características histológicas estudadas obteve diferenças entre os três grupos de doentes.

Considerando os três grupos de doentes e as respectivas pontuações histológicas, encontrou-se uma diferença estatisticamente significativa entre o Grupo 1 e o Grupo 2, este último com uma pontuação inferior ( $p=0.023$ ) (Figura 1).



**Figura 1** – Pontuação histológica comparada com os três grupos de doentes

Na tabela seguinte são apresentados os dados histológicos, separados pelos grupos de doentes considerados.

**Tabela 1** – Número de doentes de cada grupo que apresentou cada uma das características histológicas

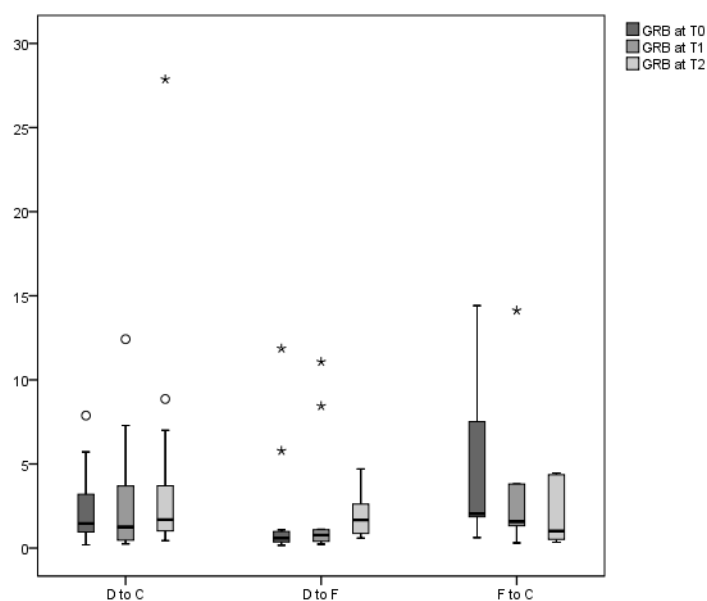
	Esteatose			Infiltração neutrofílica			Classificação de Suzuki								
							Congestão sinusoidal			Balonização			Necrose		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
C para C (n=27)	14 51%	15 55%	12 44%	11 40%	12 44%	17 62%	14 51%	15 55%	18 66%	2 7%	3 11%	2 7%	4 14%	7 25%	13 48%
C para PAF (n=15)	4 26%	3 20%	2 13%	3 20%	4 26%	5 33%	5 33%	7 46%	5 33%	2 13%	3 20%	0	3 20%	4 26%	3 20%
PAF para C (n=12)	4 33%	4 33%	4 33%	1 8%	2 16%	11 91%	6 50%	8 66%	10 83%	1 8%	1 8%	0	2 16%	2 16%	9 75%

### 4.3. Resultados de expressão genética

Em relação à expressão genética da maioria dos genes do painel estudado, evidenciou-se uma significativa diferença entre o Grupo 3 (enxerto PAF para receptores cirróticos) e os outros dois grupos.

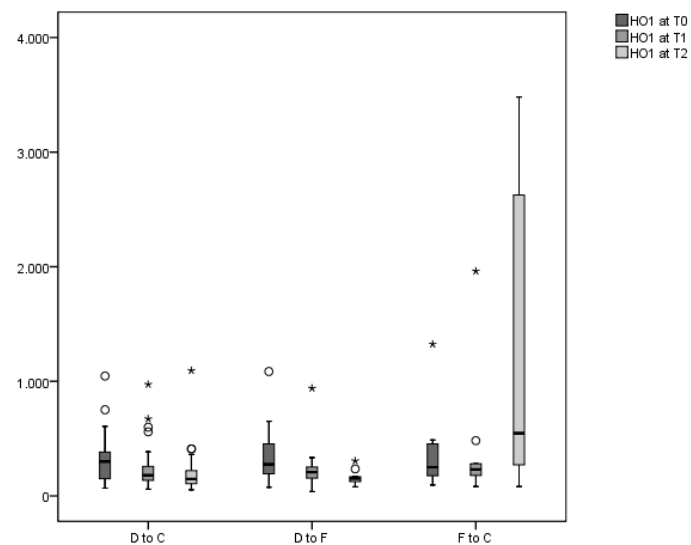
Neste grupo, foi observada uma expressão diferente de IL 1 $\beta$  em T0 ( $p=0.076$ ), menor em relação ao grupo 1 mas maior em relação ao grupo 2.

A Granzima B em T0 obteve uma expressão maior, com significado estatístico, relativamente aos outros grupos ( $p=0.013$ ), mais marcada relativamente ao grupo 2 ( $p=0.011$ ) (Figura 2).

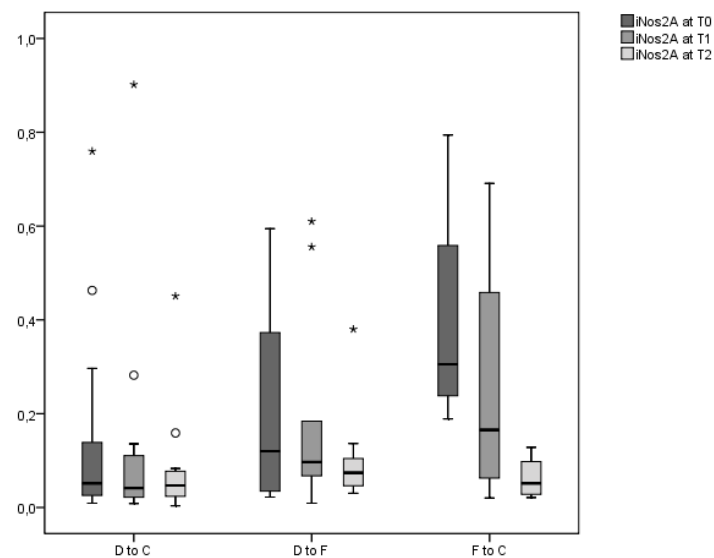


**Figura 2** - Evolução temporal da expressão de Granzima B (nível relativo de mRNA) nos três grupos. A expressão genética da Granzima B em T0 revelou uma diferença estatisticamente significativa entre os Grupos 2 e 3 ( $p=0.011$ ).

Também se registou no grupo 3 uma marcada diferença na expressão de genes relacionados com uma reacção pró inflamatória mais atenuada (maior expressão), de iNOS em T0 ( $p=0.025$ ) e HO1 em T2 ( $p=0.019$ ), ambos estatisticamente significantes (Figura 3 e Figura 4).



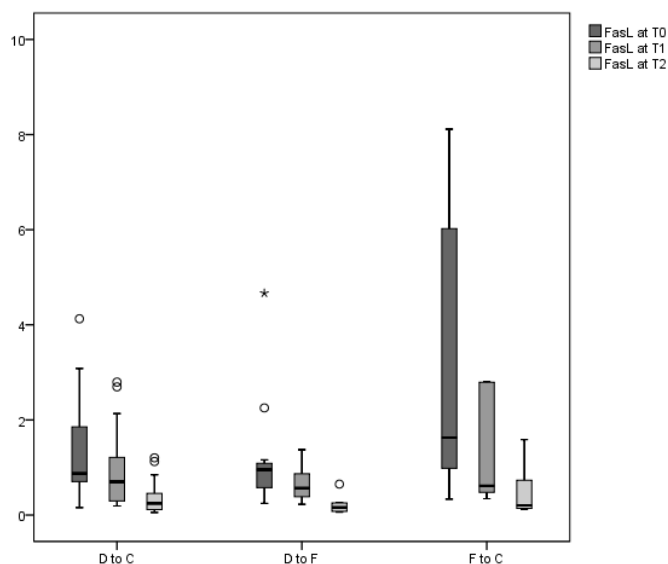
**Figura 3** - Evolução temporal da expressão de HO1 (nível relativo de mRNA) nos três grupos



**Figura 4** - Evolução temporal da expressão de iNOS (nível relativo de mRNA) nos três grupos



A expressão genética de FAS-ligando na biopsia pós reperfusão (T2) revelou uma evidência de diferença entre o Grupo 2 e o Grupo 3 ( $p=0.034$ ) (Figura 5).



**Figura 5** - Evolução temporal da expressão de FAS-ligando (nível relativo de mRNA) nos três grupos

#### 4.4. Resultados da análise comparativa entre expressão genética e histologia

Esta análise foi efectuada considerando dois grupos de doentes, de acordo com a pontuação da classificação histológica: até 5 pontos e com 6 ou mais pontos.

A expressão genética de IL-1 $\beta$  na biopsia no princípio da operação de colheita (T0) revelou uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo de doentes com pontuação histológica inferior (menor expressão) e o grupo com pontuação superior ( $p=0.025$ ).

A expressão genética de Selectina E (SELE) na biopsia pós isquémia fria (T1) revelou uma evidência de diferença entre o grupo de doentes com pontuação histológica inferior (menor expressão) e o grupo com pontuação superior ( $p=0.038$ ).

A expressão genética de Granzima B na biopsia pós reperfusão (T2) revelou uma evidência de diferença entre o grupo de doentes com pontuação histológica inferior (menor expressão) e o grupo com pontuação superior ( $p=0.056$ ).

A expressão genética de HO1 na biopsia no princípio da operação de colheita (T0) revelou uma evidência de diferença entre o grupo de doentes com pontuação histológica inferior (menor expressão) e o grupo com pontuação superior ( $p=0.056$ ).

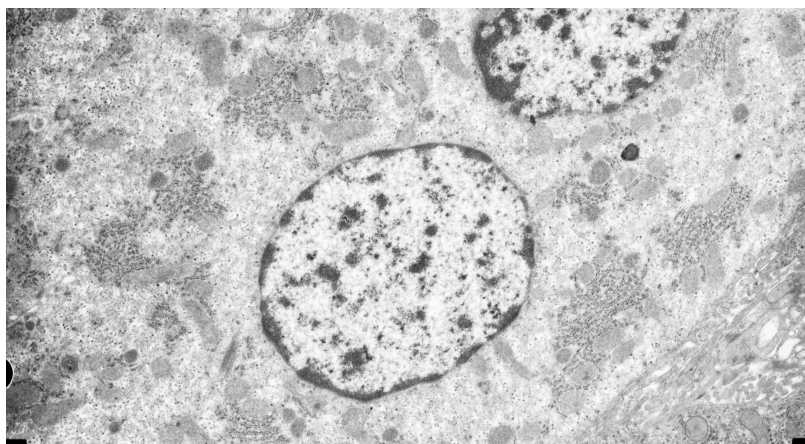
Todos estes resultados estão apresentados nas Tabelas do Anexo 1.

Os restantes resultados, referentes às diferenças de expressão genética dos figados PAF e de dadores cadáver são apresentados num dos trabalhos publicados no âmbito desta Tese (Genetic expression profile in human liver grafts during ischemia reperfusion injury: comparison of FAP and deceased donor liver grafts, *Transplantation Proceedings, in press*), Anexo 2.

#### 4.5. Resultados da microscopia Electrónica

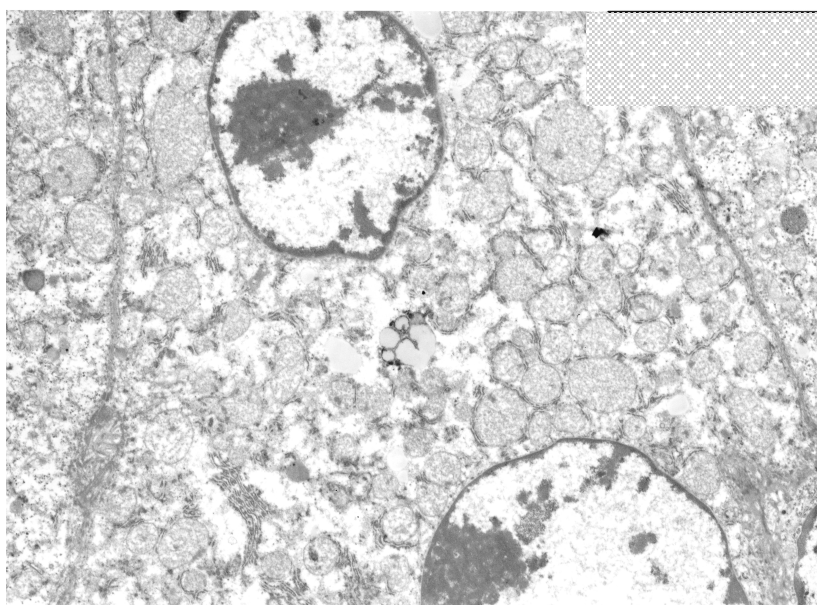
As biopsias obtidas para os enxertos selecionados, foram obtidas antes da implantação do enxerto (T1) e pós reperfusão (T2).

**Biopsia em T1 (final da isquémia fria)** – Documenta aspectos ultraestruturais das células hepáticas, onde se visualizam as características antes da reperfusão. Na Figura 6 apresenta-se um hepatocito sem alterações relevantes, com grande núcleo de contorno regular e redondo e sem aglutinação da cromatina, mitocôndrias de calibre normal. Visualizam-se, dispersos no citoplasma, discretos grânulos de lipofuscina, por prováveis antecedentes etanólicos do dador.

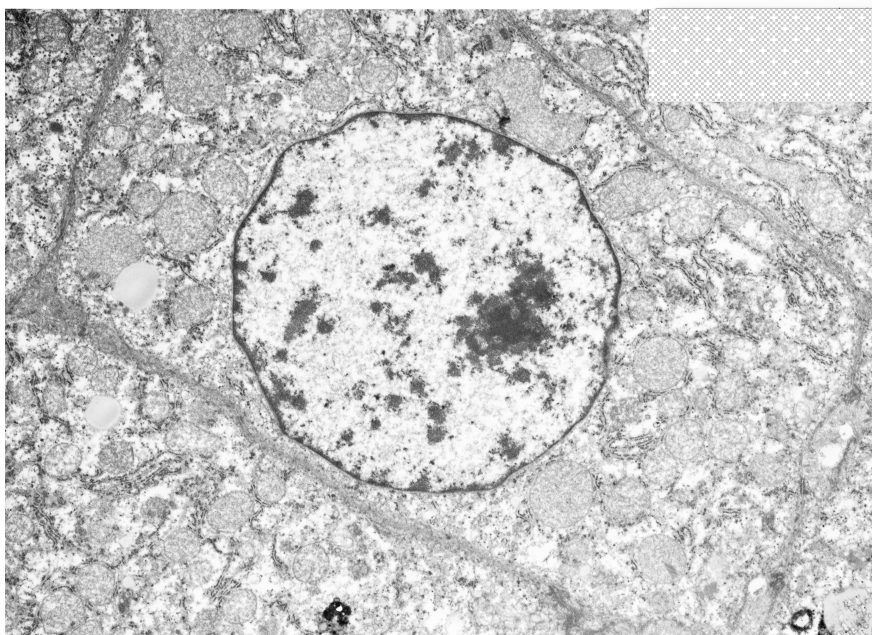


**Figura 6** – Hepatocito no final da isquémia fria, microscopia electrónica de transmissão (Prof. Dr. A.P. Alves de Matos, Sector de Microscopia Electrónica, Hospital Curry Cabral).

**Biopsia em T2 (pós reperfusão)** – Documenta aspectos ultraestruturais das células hepáticas, onde se visualizam características pós reperfusão nos hepatocitos. Estes apresentam-se edemaciados, com aglutinação da cromatina e matriz clara; apresentam também mitocôndrias aumentadas de volume por edema, e arredondadas, perdendo a forma habitual em bastonete e as suas cristas internas (Figuras 7 e 8).



**Figura 7** – Hepatocito na pós reperfusão, microscopia electrónica de transmissão (Prof. Dr. A.P. Alves de Matos, Sector de Microscopia Electrónica, Hospital Curry Cabral).



**Figura 8** – Hepatocito na pós reperfusão, microscopia electrónica de transmissão (Prof. Dr. A.P. Alves de Matos, Sector de Microscopia Electrónica, Hospital Curry Cabral)

## ANEXO 1 - Expressão genética por grupo e por pontuação histológica

**Tabela 1 - Expressão genética (valores da mediana) em todos os tempos por grupo**

	Total doentes	Grupo 1 (C - C)	Grupo 2 (C - P)	Grupo 3 (P - C)	Valor P
<b>FASL (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>					
<b>T0</b>	0.98 (0.72-2.16)	0.91 (0.70-2.18)	0.96 (0.42-1.16)	1.63 (0.86-5.40)	0.289
<b>T1</b>	0.68 (0.34-1.50)	0.68 (0.32-1.37)	0.57 (0.35-0.95)	1.84 (0.55-10.81)	0.057
<b>T2</b>	0.25 (0.11-0.52)	0.32 (0.12-0.52)	0.16 (0.07-0.26)	0.59 (0.16-1.54)	0.037 <sup>a</sup>
<b>GRB (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>					
<b>T0</b>	1.51 (0.61-3.70)	1.51 (1.00-3.70)	0.59 (0.31-1.08)	2.04 (1.64-10.96)	0.013 <sup>b</sup>
<b>T1</b>	1.33 (0.47-5.72)	1.59 (0.47-5.97)	0.78 (0.36-1.12)	2.86 (1.39-12.00)	0.153
<b>T2</b>	2.08 (0.94-4.52)	2.09 (1.06-4.42)	1.68 (0.83-2.85)	4.46 (0.76-32.09)	0.274
<b>HO1 (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>					
<b>T0</b>	276.60 (153.4-419.45)	301 (145.4-384.95)	274.84 (143.5-500.04)	250.10 (168.7-471.64)	0.986
<b>T1</b>	198.06 (139.9-291.16)	184.42 (134.9-337.15)	207.62 (141.18-258.8)	231.53 (146.0-381.66)	0.829
<b>T2</b>	162.24 (120.9-315.76)	153.66 (103.2-247.84)	152.43 (124.6-170.19)	547.35 (203.5-2671.1)	0.019 <sup>c</sup>
<b>IL-6 (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>					
<b>T0</b>	0.48 (0.15-2.64)	0.78 (0.20-3.39)	0.20 (0.09-0.74)	0.24 (0.06-1.71)	0.116
<b>T1</b>	1.62 (0.50-4.77)	2.42 (0.45-6.20)	0.73 (0.36-1.62)	3.80 (1.22-8.09)	0.164
<b>T2</b>	7.19 (2.76-13.42)	7.19 (1.81-10.59)	4.91 (2.77-9.97)	14.78 (2.98-25.67)	0.413
<b>IL-1β (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>					
<b>T0</b>	12.17 (2.83-24.01)	16.63 (6.57-35.35)	5.32 (1.26-14.58)	10.66 (4.25-21.46)	0.076
<b>T1</b>	22.67 (8.31-49.51)	24.41 (8.98-50.85)	8.53 (5.10-22.60)	27.94 (16.99-90.43)	0.118
<b>T2</b>	49.91 (22.40-85.84)	55.39 (26.84-96.84)	45.28 (31.50-56.32)	30.70 (17.73-184.33)	0.804
<b>iNOS2A (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>					
<b>T0</b>	0.15 (0.03-0.32)	0.10 (0.03-0.23)	0.08 (0.03-0.37)	0.30 (0.25-0.68)	0.025 <sup>d</sup>
<b>T1</b>	0.09 (0.02-0.19)	0.08 (0.02-0.12)	0.09 (0.02-0.18)	0.23 (0.11-0.76)	0.083
<b>T2</b>	0.06 (0.03-0.13)	0.04 (0.02-0.08)	0.07 (0.05-0.11)	0.13 (0.04-0.55)	0.127
<b>SELE (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>					
<b>T0</b>	1.17 (0.49-3.26)	2.36 (0.50-3.50)	0.98 (0.76-2.42)	0.69 (0.21-3.04)	0.439
<b>T1</b>	1.53 (0.61-5.45)	2.05 (0.52-6.47)	1.16 (0.60-1.70)	1.65 (0.75-9.17)	0.528
<b>T2</b>	2.30 (1.40-4.56)	1.81 (1.30-5.19)	2.35 (1.59-2.90)	2.38 (1.71-8.62)	0.666

Resultados das comparações múltiplas: <sup>a</sup> **FASL**: Grupo 2 vs Grupo 3, p=0.034; <sup>b</sup> **GRB**: Grupo 2 vs Grupo 3, p=0.011; <sup>c</sup> **HO1**: Grupo 2 vs Grupo 3, p=0.035; Grupo 1 vs Grupo 3, p=0.031; <sup>d</sup> **iNOS2A**: Grupo 1 vs Grupo 3, p=0.022

**Tabela 2** - Expressão genética (valores da mediana) em todos os tempos por pontuação histológica

Gene	Pontuação histológica baixa (0-5)	Pontuação histológica alta (≥6)	Valor P
<b>FASL (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>			
<b>T0</b>	0.99 (0.62-2.33)	0.90 (0.73-2.06)	0.910
<b>T1</b>	0.74 (0.34-1.91)	0.61 (0.35-1.22)	0.602
<b>T2</b>	0.19 (0.10-0.57)	0.26 (0.13-0.45)	0.521
<b>GRB (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>			
<b>T0</b>	1.47 (0.62-2.50)	1.60(0.72-5.76)	0.272
<b>T1</b>	1.06 (0.50-3.51)	1.86 (0.45-6.68)	0.452
<b>T2</b>	1.31 (0.59-3.42)	2.72 (1.48-5.68)	0.056
<b>HO1 (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>			
<b>T0</b>	246.19 (139.70-324.76)	351.52 (198.08-539.98)	0.056
<b>T1</b>	193.25 (139.91-303.19)	219.57 (137.36-311.26)	0.947
<b>T2</b>	156.29 (82.60-319.91)	181.09 (126.30-326.47)	0.538
<b>IL-6 (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>			
<b>T0</b>	0.25 (0.08-2.31)	0.49 (0.20-3.38)	0.245
<b>T1</b>	0.82 (0.40-3.33)	2.91 (0.86-8.74)	0.097
<b>T2</b>	7.60 (3.19-14.15)	6.59 (2.54-10.83)	0.538
<b>IL-1β (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>			
<b>T0</b>	7.42 (2.36-16.93)	16.03 (9.34-37.03)	0.025
<b>T1</b>	12.15 (5.47-63.78)	27.41 (12.69-50.62)	0.326
<b>T2</b>	39.16 (23.63-79.78)	52.86 (20.80-96.84)	0.775
<b>iNOS2A (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>			
<b>T0</b>	0.16 (0.03-0.30)	0.14 (0.03-0.36)	0.570
<b>T1</b>	0.08 (0.02-0.15)	0.11 (0.03-0.42)	0.371
<b>T2</b>	0.06 (0.03-0.09)	0.06 (0.03-0.15)	0.569
<b>SELE (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>			
<b>T0</b>	0.88 (0.30-2.98)	2.07 (0.56-3.44)	0.197
<b>T1</b>	0.77 (0.47-2.73)	1.89 (0.98-5.71)	0.038
<b>T2</b>	2.19 (1.53-3.83)	2.55 (1.29-6.79)	0.629



## Genetic Expression Profile of Human Liver Grafts in Ischemia-Reperfusion Injury: Comparison of Familial Amyloidotic Polyneuropathy and Deceased-Donor Liver Grafts

J. Paulino<sup>a,\*</sup>, E. Vigia<sup>a</sup>, P. Marcelino<sup>c</sup>, O. Abade<sup>c</sup>, J. Sobral<sup>g</sup>, D. Ligeiro<sup>e</sup>, A. Carvalho<sup>b</sup>, M. Alves<sup>f</sup>, A.L. Papoila<sup>d,f</sup>, H. Trindade<sup>e</sup>, and E. Barroso<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Centro Hepatobiliopancreático e de Transplantação and <sup>b</sup>Serviço de Anatomia Patológica, Hospital Curry Cabral, <sup>c</sup>CEDOC and <sup>d</sup>Departamento de Bioestatística, Faculdade de Ciências Médicas, and <sup>e</sup>Centro de Histocompatibilidade do Sul and <sup>f</sup>Departamento de Bioestatística, Universidade Nova de Lisboa, Lisbon; and <sup>g</sup>Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras, Portugal

### ABSTRACT

This study aimed to compare the histologic and molecular gene expression at several surgical times (beginning of harvesting, T0; end of cold ischemia period, T1; and after reperfusion, T2) to characterize the ischemia-reperfusion injury (IRI) in deceased-donor liver grafts harvested from patients with familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). For this purpose, 54 patients undergoing liver transplantation were studied and divided into 3 groups: deceased donor to cirrhotic recipient (group 1;  $n = 27$ ), deceased donor to FAP recipient (group 2;  $n = 15$ ), and FAP donor to cirrhotic recipient (group 3;  $n = 12$ ). The main comparison was performed between a histologic score (Suzuki score, adding steatosis and neutrophil infiltration), and molecular gene expression of the following genes: interleukin (IL) 1 $\beta$ , IL-6, E-selectin, Fas-ligand, granzyme B, heme oxygenase 1 (HO1), and nitric oxide synthetase (iNOS2A). We observed less neutrophil infiltration levels in group 3 in sample T0 ( $P = .0082$ ), which was associated with gene expression of HO1 in the biopsies at T2 ( $P = .022$ ). In group 3, the molecular expression of genes related to attenuated proinflammatory reaction during IRI, iNOS2A at T0 and HO1 at T2, was detected. We conclude that FAP liver grafts express differently the genes associated with an attenuated proinflammatory reaction, presenting less neutrophil infiltration at harvesting. These findings add more knowledge about the better short-term outcomes in patients receiving this type of liver graft.

ISCHEMIA and reperfusion injury (IRI) is universal and unavoidable in liver transplantation (LT); its clinical consequences are variable, but they can be serious and lead to graft failure or loss, as well as be responsible for >10% of primary graft nonfunction or malfunction [1].

Recognized and described for the first time by Toledo-Pereyra [2], and clinically characterized by Aggarwal et al [3], IRI has an estimated incidence of 30%, although some other authors report higher incidence. The events associated with IRI are frequently characterized as inflammatory processes: oxidative stress in the first 2 hours after reperfusion and cellular-mediated injury 6–48 hours after [4,5].

To expand the scarce pool of liver donors, our department started using liver grafts explanted from patients suffering from familial amyloidotic polyneuropathy (FAP), which became a special category of whole living donors in a

procedure called sequential or “domino” transplantation. In this procedure, the FAP patient receives a deceased-donor graft and the FAP liver is implanted in another patient [6]. It is a liver explanted from a young stable donor, with a short cold ischemia time and work performed by the same surgical team. The advantages of using FAP livers for donation include donor pool expansion and shortening of the waiting list. Moreover, the quality of these grafts has

Ana Luisa Papoila's work was sponsored by national funds through the Fundação Nacional para a Ciência e Tecnologia, Portugal (project PEst-OE/MAT/UI0006/2011).

\*Address correspondence to Jorge Paulino, Centro Hepatobiliopancreático e de Transplantação, Hospital Curry Cabral, Universidade Nova de Lisboa, Rua da Beneficência, 8-1069-166 Lisboa, Portugal. E-mail: fusilis@gmail.com

0041-1345/14/\$—see front matter  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2014.05.013>

© 2014 by Elsevier Inc. All rights reserved.  
360 Park Avenue South, New York, NY 10010-1710

proved to be good, and short-term outcome has been reported to be superior to deceased-donor liver grafts [7].

Although some possible explanations have been considered, we also hypothesize that IRI can be influenced by this type of surgery and donation. The aim of the present work was to study IRI with the use of different diagnostic tools in different donors and receptors. For this purpose, we compared the results of hepatic biopsies, collected at different surgical times, with the use of classic histology, molecular markers, and gene expression from FAP liver grafts, whole liver living-donor grafts, and deceased-donor grafts.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

From 2004 to 2011, 856 patients underwent LT in our center. Data collection was highly dependent on the availability of the surgical team, as well as on the transport of collected samples and laboratory convenience. For this reason, only 54 patients were included.

Data collected consisted of: age, sex, main pathology, blood group, preoperative Model for End-Stage Liver Disease (MELD) score, Child-Pugh score, and Survival Outcomes Following Liver Transplantation (SOFT) score [8]. The highest aminotransferase value after LT, cold ischemia time, and donor's age were also collected, as well as the number of red cell packed units (RSPU) and fresh frozen plasma units (FFP) used during LT.

We decided to separate the deceased-donor grafts according to their allocation, because FAP patients usually receive grafts from younger donors. On the other hand, the occurrence of IRI may be differently expressed according to the recipient's characteristics.

The patients were therefore divided into the following groups: deceased donor to cirrhotic recipient (group 1;  $n = 27$ ), deceased donor to FAP recipient (group 2;  $n = 15$ ), and FAP donor to cirrhotic recipient (group 3;  $n = 12$ ).

### Tissue Sample Collection

The harvesting was performed by experienced surgical teams at the 4 LT centers in Portugal, and in all cases the preservation solution was Celsior (Sangstat, Lyon, France) and the rapid Starzl technique was used [9].

Needle biopsies were collected from 54 liver grafts at 3 different moments: beginning of harvesting (T0), end of cold ischemia period (T1), and after reperfusion at the end of the operation (T2).

All the biopsy fragments were divided in half, one sample being processed for molecular marker expression and the other submitted to a comparative study by usual histologic procedures, following the routine of our hospital.

In the case of FAP grafts, informed consents of the donor patients and agreement of the Ethical Commission of the hospital were obtained.

### Histologic Analysis

The tissue fragments were collected in vials containing formaldehyde and processed in classic hematoxylin-eosin cuts. The histologic Suzuki classification [10] was used to quantify the lesions. Besides the parameters composing this classification (sinusoidal congestion, vacuolization/ballooning, and necrosis), 2 additional parameters were studied: grade of steatosis and neutrophil infiltration. For steatosis, 4 grades were considered: none (0%, 0 points score), slight (<30%, 1 point score), moderate (30%–60%, 2 points score), and

intense (>60%, 3 points score). Both macro- and microvesicular steatosis were evaluated: macrovesicular, as a reversible condition (defined as a single vacuole pushing the nucleus aside); and microvesicular, associated with deficiency of beta oxidation of the lipids and defined as fine and multiple droplets dispersed in the cell cytoplasm. Both were considered to be capable of amplifying the IRI, enough to induce the phenomena of interference in the hepatic microcirculation (lipopeliosis; especially the macrosteatosis).

Neutrophils infiltration was graded as scarce (<5 cells per high-power field [HPF], 0 points); 5–30 cells per HPF, 1 point; and >30 to <60 cells per HPF, 2 points.

To the score provided by the Suzuki classification, we added the other 2 parameters (steatosis and neutrophil infiltration), thus obtaining a final score consisting on the sum of all of the scores. Patients were then divided, according to this final score, into 2 groups: lower histologic score (0–5) or higher histologic score ( $\geq 6$ ).

### Molecular and Gene Expression

The tissue fragments were collected and immediately preserved in RNAlater (Ambion). Total RNA was extracted, from all samples, followed by cDNA synthesis. mRNA levels of a proinflammatory genes panel (interleukin [IL] 1 $\beta$ , IL-6, E-selectin [SEAL], Fas-ligand [FASL], granzyme B [GRB], heme oxygenase 1 [HO1], and inducible nitric oxide synthetase [iNOS2A]) were determined by quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR). The standard Taqman PCR kit protocol and Taqman fluorogenic probes were used in all gene expression assays, and PCR was performed in a 7900HT Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Sample 1 was used as a genetic expression reference (nonischemic).  $\beta$ -Actin was used as housekeeping gene for results normalization.

The relative analysis of genetic expression was performed using an adapted formula  $2^{-\Delta\Delta C_t} \times 1,000$  of Livak et al [11], which infers the number of mRNA molecules of a certain gene per 1,000 molecules of the endogenous control samples.

### Statistical Analysis

An exploratory analysis was carried out for all variables. Categorical data are presented as frequencies and percentages, and continuous variables as mean and standard deviation or median and interquartile range. Univariable analysis was done with the use of nonparametric tests ( $\chi^2$  or Fisher exact test, Mann-Whitney, and Kruskal-Wallis) because of the existence of outliers, high variability, and skewed distributions.

The significance level was considered to be  $\alpha = 0.05$ , and 95% confidence intervals (CI) were calculated whenever appropriate. All data were analyzed with the use of the Statistical Package for the Social Sciences for Windows version 19.0 (SPSS, Chicago, Illinois).

## RESULTS

### Patients

The general characterization data of all patients are presented in Table 1. Table 2 presents information regarding analytical data, divided by the 3 considered groups. Several differences among the groups can be observed. Donor age was significantly higher in group 2 ( $P = .01$ ) as was the intraoperative need for RCPU and FFP in group 1. Although the cold ischemia time in group 2 was higher, it did not reach statistical significance. In addition, the aminotransferase activity level, a usual marker of liver injury, did not differ significantly among groups.



**Table 1. General Characteristics of the Studied Population (n = 54), n (%)**

Parameter	Result
Age (y, mean $\pm$ SD)	45 $\pm$ 14
Male	42 (78%)
Blood group	
A	28 (52%)
B	3 (6%)
AB	3 (6%)
O	20 (37%)
MELD, mean (SD)	16 (8) (n = 36)
CTP class	
A	20 (55%)
B	10 (27%)
C	6 (18%)
Main disease	
FAP	15 (27%)
HCV	16 (29%)
Alcoholic cirrhosis	14 (25%)
Biliary diseases	4 (7%)
Autoimmune diseases	2 (3%)
Metabolic diseases	4 (7%)
Acute liver failure	3 (5%)
SOFT	
Low risk	37 (69%)
Low-moderate risk	12 (22%)
High-moderate risk	5 (9%)

Abbreviations: MELD, Model for End-Stage Liver Disease; CPT, Child-Turcotte-Pugh; FAP, familial amyloid polyneuropathy; HCV, hepatitis C virus; SOFT, Survival Outcomes Following Liver Transplantation.

#### Histologic Results

The histologic scores varied from 0 to a maximum of 18. Regarding neutrophil infiltration, we observed less infiltration in group 3 in sample T0 ( $P = .082$ ). Additionally, we observed that the gene expression of HO1 in the biopsies at T2 was associated with neutrophil infiltration ( $P = .022$ ). None of the other histologic items revealed any difference among the 3 groups of patients.

When considering the 3 groups of patients and corresponding histologic scores, we found a statistically significant difference between group 1 and group 2, with a higher score in the latter ( $P = .023$ ).

#### Gene Expression Results

Regarding the expression of most of the genes, an important difference was detected between group 3 and the other 2 groups. In group 3, we observed different expression of

IL-1 $\beta$  at T0 ( $P = .076$ ) and GRB at T0 ( $P = .013$ ), but also a marked difference in molecular and gene expression of genes related to attenuated proinflammatory reaction, namely, iNOS at T0 ( $P = .025$ ) and HO1 at T2 ( $P = .019$ ).

In Fig 1 we present the differences of iNOS among the 3 groups, and its evolution in time, according to the tissue sample collection. In Fig 2 we present the same data regarding HO1.

Other differences regarding molecular gene expression could be described. The gene expression of GRB in the biopsy taken in the beginning of the donor operation (T0) revealed a statistically significant difference between group 2 and group 3 ( $P = .011$ ). At T1 and T2, although not statistically different, the expression of this gene remained larger in all collected tissue samples of group 3 (Table 3).

The gene expression of FASL in the biopsy taken after reperfusion (T2) revealed a statistically significant difference between group 2 and group 3 ( $P = .034$ ).

#### Comparative Analysis Between Molecular and Gene Expression and Histologic Findings

The gene expression of IL-1 $\beta$  in the biopsy taken at the beginning of the donor operation (T0) revealed a statistically significant difference between the group of patients with lower histologic score and the group of patients with higher histologic score ( $P = .025$ ). The gene expression of E-selectin in the biopsy taken after cold ischemia (T1) revealed a statistically significant difference between the group of patients with lower histologic score and the group of patients with higher histologic score ( $P = .038$ ). The gene expression of GRB in the biopsy taken after reperfusion (T2) also revealed a difference between patients with lower and higher histologic scores ( $P = .056$ ). The gene expression of FASL in the biopsy taken after reperfusion (T2) revealed a statistically significant difference between group 2 and group 3 ( $P = .034$ ). The gene expression of HO1 in the biopsy taken at the beginning of the donor operation (T0) revealed a difference between patients with lower and higher histologic scores ( $P = .056$ ; Fig 3).

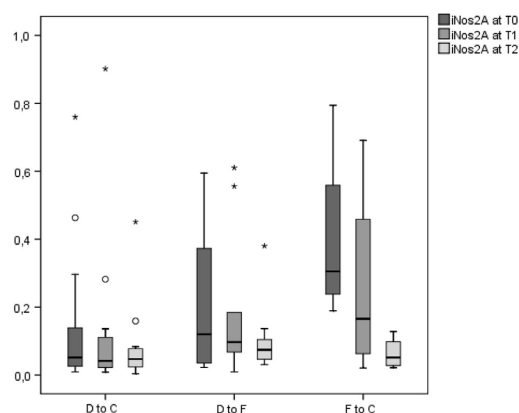
#### DISCUSSION

The present study intended to establish relationships between the data obtained from classic histologic data, with the use of hematoxylin-eosin cuts, and a more sophisticated approach with the use of molecular markers to try to score the quality of the liver graft. We found some differences

**Table 2. Analytical Data of Each Group Considered, Mean  $\pm$  SD**

Parameter	Group 1 (n = 27)	Group 2 (n = 15)	Group 3 (n = 12)
Peak ALT (IU/L)	838.10 $\pm$ 565.49	887.20 $\pm$ 705.79	938.13 $\pm$ 869.97
Peak AST (IU/L)	1,016.67 $\pm$ 895.48	1,030.80 $\pm$ 653.01	839.13 $\pm$ 583.51
Donor's age (y)	35.70 $\pm$ 15.02	41.08 $\pm$ 16.02	30.20 $\pm$ 3.77
Cold ischemia time (min)	465.08 $\pm$ 140.64	497.91 $\pm$ 116.73	455.86 $\pm$ 125.64
RCPU (units)	9.74 $\pm$ 5.65	5.00 $\pm$ 2.98	6.50 $\pm$ 5.15
FFP (units)	28.90 $\pm$ 12.88	18.25 $\pm$ 10.00	17.29 $\pm$ 5.41

Abbreviations: ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; RCPU, red cell packed units; FFP, fresh frozen plasma.

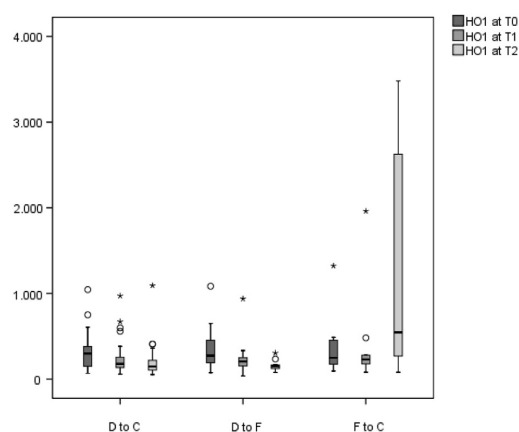


**Fig 1.** Temporal evolution of the expression of inducible nitric oxide synthetase (iNOS; relative mRNA level) in the 3 groups.

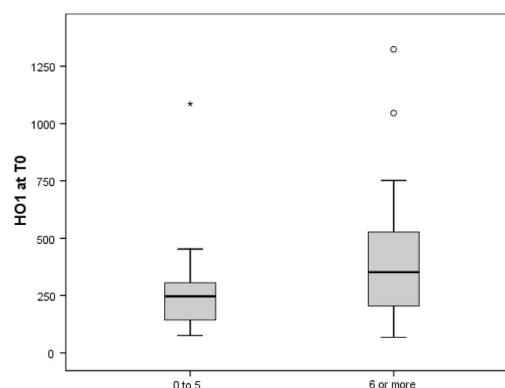
regarding FAP livers, which expressed markers related to attenuated proinflammatory response at T2, as well as less neutrophil infiltration at T0, expression of E-selectin in the biopsy taken in cold ischemia (T1), and a statistically significant difference between the groups of patients with lower histologic score.

We had decided to separate the grafts into 3 different clinical categories. The present data confirmed the differences among the grafts, namely higher donor age in group 2 and higher use of RCPU and FFP during surgery in group 1. It was thought that these differences could influence IRI during LT, because they are similar to real clinical situations in our LT center.

The FAP donor is a particular living donor. In earlier publications we observed a better short-term outcome in patients receiving FAP liver grafts; this fact was attributed



**Fig 2.** Temporal evolution of heme oxygenase 1 (HO1; relative mRNA level) expression in the 3 groups.



**Fig 3.** Distribution of heme oxygenase 1 (HO1) at T0 for lower and higher histologic score group.

to specific technical conditions, related to both harvesting and liver quality. The present data provide more information about this particular situation not yet described in the literature. At T0 we found less neutrophil infiltration in these grafts. These results are in agreement with those reported in the literature, where a particular series of events, such as the adrenergic or endocrine storm or even the standard procedures for donor preservation, may affect the deceased-donor graft and may play a key role in the histologic differences found [12].

Moreover, at T0 the expression of some of the proinflammatory and protective genes was different in the FAP donor graft, namely GRB and iNOS2A. The relevance of proinflammatory phenomena in LT is widely described, and linked to the post-reperfusion syndrome. Moreover, our findings suggest that the harvesting conditions and the category of harvested grafts may eventually be important for further development of serious complications from the IRI syndrome.

We also found a specific molecular gene expression in FAP living-donor grafts (group 3) of HO1, a marker related not only to cold ischemia time but also to protection against apoptosis and oxidative stress. It is noteworthy that, when we compared the temporal evolution of this gene expression, the pattern of expression in FAP grafts was larger and increased through the procedure, opposite to the evolution in the other 2 groups of deceased liver grafts. HO1 catabolizes heme into 3 products: carbon monoxide (CO), biliverdin (which is rapidly converted to bilirubin), and free iron (which leads to the induction of ferritin, an iron-binding protein). HO1 serves as a “protective” gene by virtue of the antiinflammatory, antiapoptotic, and antiproliferative actions of  $\geq 1$  of these 3 products [13]. It has been suggested in the literature that the products of HO1 action could be valuable therapeutic agents and that HO1 functions as a “therapeutic funnel,” mediating the beneficial effects attributed to other

**Table 3. Main Differences Between Groups (Gene Expression), Median (Interquartile Range)**

Characteristic	All Patients (n = 54)	Group 1	Group 2	Group 3	P Value
<b>Fas ligand</b>					
T0	0.98 (0.72–2.16)	0.91 (0.70–2.18)	0.96 (0.42–1.16)	1.63 (0.86–5.40)	.289
T1	0.68 (0.34–1.50)	0.68 (0.32–1.37)	0.57 (0.35–0.95)	1.84 (0.55–10.81)	.057
T2	0.25 (0.11–0.52)	0.32 (0.12–0.52)	0.16 (0.07–0.26)	0.59 (0.16–1.54)	.037
<b>Granzyme B</b>					
T0	1.51 (0.61–3.70)	1.51 (1.00–3.70)	0.59 (0.31–1.08)	2.04 (1.64–10.96)	.013
T1	1.33 (0.47–5.72)	1.59 (0.47–5.97)	0.78 (0.36–1.12)	2.86 (1.39–12.00)	.153
T2	2.08 (0.94–4.52)	2.09 (1.06–4.42)	1.68 (0.83–2.85)	4.46 (0.76–32.09)	.274
<b>Heme oxygenase 1</b>					
T0	276.60 (153.41–419.45)	301 (145.41–384.95)	274.84 (143.52–500.04)	250.10 (168.71–471.64)	.986
T1	198.06 (139.91–291.16)	184.42 (134.98–337.15)	207.62 (141.18–258.81)	231.53 (146.03–381.66)	.829
T2	162.24 (120.97–315.76)	153.66 (103.20–247.84)	152.43 (124.61–170.19)	547.35 (203.54–2671.12)	.019
<b>Interleukin-6</b>					
T0	0.48 (0.15–2.64)	0.78 (0.20–3.39)	0.20 (0.09–0.74)	0.24 (0.06–1.71)	.116
T1	1.62 (0.50–4.77)	2.42 (0.45–6.20)	0.73 (0.36–1.62)	3.80 (1.22–8.09)	.164
T2	7.19 (2.76–13.42)	7.19 (1.81–10.59)	4.91 (2.77–9.97)	14.78 (2.98–25.67)	.413
<b>Interleukin-1<math>\beta</math></b>					
T0	12.17 (2.83–24.01)	16.63 (6.57–35.35)	5.32 (1.26–14.58)	10.66 (4.25–21.46)	.076
T1	22.67 (8.31–49.51)	24.41 (8.98–50.85)	8.53 (5.10–22.60)	27.94 (16.99–90.43)	.118
T2	49.91 (22.40–85.84)	55.39 (26.84–96.84)	45.28 (31.50–56.32)	30.70 (17.73–184.33)	.804
<b>Inducible nitric oxide synthetase</b>					
T0	0.15 (0.03–0.32)	0.10 (0.03–0.23)	0.08 (0.03–0.37)	0.30 (0.25–0.68)	.025
T1	0.09 (0.02–0.19)	0.08 (0.02–0.12)	0.09 (0.02–0.18)	0.23 (0.11–0.76)	.083
T2	0.06 (0.03–0.13)	0.04 (0.02–0.08)	0.07 (0.05–0.11)	0.13 (0.04–0.55)	.127
<b>E-Selectin</b>					
T0	1.17 (0.49–3.26)	2.36 (0.50–3.50)	0.98 (0.76–2.42)	0.69 (0.21–3.04)	.439
T1	1.53 (0.61–5.45)	2.05 (0.52–6.47)	1.16 (0.60–1.70)	1.65 (0.75–9.17)	.528
T2	2.30 (1.40–4.56)	1.81 (1.30–5.19)	2.35 (1.59–2.90)	2.38 (1.71–8.62)	.666

molecules, such as IL-10, iNOS, and prostaglandins [14]. From the present data, it seems that this particular kind of living-donor graft has the intrinsic capacity of synthesize this protective gene.

Altogether, our findings suggest that the FAP liver graft is a viable graft with less ischemia-related and preservation phenomena compared with deceased-donor grafts.

Other relevant findings are related to the comparison between the histologic findings and molecular and gene expression. We observed that the gene expression of HO1 in the biopsies at T2 correlated with neutrophil infiltration. It was thought that these neutrophils stuck in the capillary beds of the liver, where they release their toxic contents, could induce inappropriate tissue injury, leading to graft failure. However, recently, other explanations have been proposed suggesting that sequestration of neutrophils in the liver could be beneficial to host survival: Neutrophils have been shown to expel their DNA to form neutrophil extracellular traps ensnaring bacteria before dying and thus contributing to angiogenesis [15].

An earlier study using an animal sepsis model showed that induction of HO1 in neutrophils suppresses their migration into the liver during sepsis; however, the present study reveals the opposite effect, probably due to the different timing of the collected biopsies of the animal liver ischemia model that usually does not allow a significant ischemia period (usually no longer than 30 minutes) [16].

Differences in gene expression according to histologic data also deserve to be mentioned. IL-1 $\beta$  in the biopsy taken at the beginning of the donor operation (T0) revealed a statistically significant difference between the group of patients with lower histologic score and the group of patients with higher histologic score ( $P = .025$ ). Such a relationship has been described in a wild-type mouse liver warm ischemia and IR model, with correlation of the Suzuki grading of histologic liver IR damage and the generation of active IL-1 $\beta$  from its inactive pro-IL-1 $\beta$  precursor [17]. Being a key mediator of the inflammatory response, it is essential for the host response and resistance to pathogens. It also exacerbates damage during acute tissue injury. Therefore, it is not surprising that there is a high level of interest in how this protein is produced and exported from cells. It is produced and secreted by a variety of cell types, although the vast majority of studies have focused on its production within cells of the innate immune system, such as Kupffer cells. Being a type 1 cytokine, IL-1 $\beta$  is up-regulated early in the inflammatory process, explaining why it showed expression in the first biopsy, in response to brain death or simply liver manipulation: After being released, it activates the endothelial cells.

The different expression of iNOS in T0 illustrates another peculiarity of FAP living-donor grafts. Nitric oxide has been shown to mediate the expression of tumor necrosis factor (TNF), a well known cytokine, which seems to induce the

accumulation of neutrophils by indirect mechanisms involving the macrophage and induces the production of other cytokines [18,19]. Following IRI there is a deficit of NO inside the cell, just like the fall of expression of iNOS from sample T0 to T2 in all groups. Thus, it seems plausible that increased expression, or the administration of NO during IRI, may help to attenuate subsequent injury. Endogenous NOS (eNOS)-derived NO is hepatoprotective in liver IRI, but the role of iNOS-derived NO is much less clear and needs further research to shed light on the specific circumstances which determine the benefits, or otherwise, of NO generated from iNOS [20].

Besides, the gene expression of E-selectin in the biopsy taken in cold ischemia (T1) revealed a statistically significant difference when higher and lower histologic score groups are compared. The adhesion to the hepatic sinusoidal endothelial cells (SECs) and transmigration into liver tissue require sequential steps in which many molecules are involved [21]. The selectin family (P-, E-, and L-selectin) of adhesion molecules are expressed by sinusoidal endothelial cells. They mediate loose or rolling adhesion of leukocytes. It has been reported that E-selectin expression, and not P-selectin, is required for IRI to occur [22]. This is followed by firmer adhesion of leukocytes on SECs.

The cell adhesion molecules, such as E-selectin, are established markers of endothelial cell activation stimulated by TNF- $\alpha$ . In line with earlier observations showing up-regulation of E-selectin due to cold exposure, a study using human umbilical vein endothelial cells showed that E-selectin was indeed up-regulated after pre-exposure to cold followed by rewarming [23].

#### STUDY LIMITATIONS

The first limitation regards the number of patients involved. In this study, we faced strong limitations in sample collection owing to the dependency on the researchers' availability. Patient selection resulted in a total number of only 54 included.

We used a modified histologic score. In addition to the scores provided by the Suzuki classification, and aiming to improve the histologic characterization of the samples, we included parameters from the regular observation by the pathologists involved in the LT program, namely, neutrophil infiltration and steatosis. However, the exploratory nature of the present work did not allowed us to validate this modified classification.

#### CONCLUSION

The FAP liver grafts showed less neutrophil infiltration at the time of graft harvesting. After reperfusion, the expression level of genes related to the proinflammatory response was lower. These data may help to explain the better short-term outcome of patients receiving FAP liver grafts, as related to less intense IRI. Also, we can suspect that this reaction is related not only to cold ischemia time,

but also to the quality of the harvesting and the quality of the liver graft.

#### REFERENCES

- [1] Hilmi I, Horton CN, Planinsic RM, Sakai T, Nicolau-Raducu R, Damian D, et al. The impact of postreperfusion syndrome on short-term patient and liver allograft outcome in patients undergoing orthotopic liver transplantation. *Liver Transpl* 2008;14:504-8.
- [2] Toledo-Pereyra LH. Definition of reperfusion injury in transplantation. *Transplantation* 1987;43:931-2.
- [3] Aggarwal S, Kang Y, Freeman JA, Fortunato FL, Pinsky MR. Postreperfusion syndrome: cardiovascular collapse following hepatic reperfusion during liver transplantation. *Transplant Proc* 1987;19:54-5.
- [4] Klune JR, Tsung A. Molecular biology of liver ischemia/reperfusion injury: established mechanisms and recent advancements. *Surg Clin North Am* 2010;90:665-77.
- [5] Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury: ROS within and without. *Circ Res* 2000;86:117-8.
- [6] Furtado A, Tome L, Oliveira FJ, Furtado E, Viana J, Perdigoto R. Sequential liver transplantation. *Transplant Proc* 1997;29:467-8.
- [7] Bispo M, Marcelino P, Marques HP, Martins A, Perdigoto R, Aguiar MJ, et al. Domino versus deceased donor liver transplantation: association with early graft function and perioperative bleeding. *Liver Transpl* 2011;17:270-8.
- [8] Reichert B, Becker T, Weismuller TJ, Kleine M, Zachau L, Johanning K, et al. Value of the preoperative SOFT-score, P-SOFT-score, SALT-score and labMELD-score for the prediction of short-term patient and graft survival of high-risk liver transplant recipients with a pre-transplant labMELD-score  $\geq 30$ . *Ann Transplant* 2012;17:11-7.
- [9] Starzl TE, Miller C, Broznick B, Makowka L. An improved technique for multiple organ harvesting. *Surg Gynecol Obstet* 1987;165:343-8.
- [10] Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cejalvo D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. *Transplantation* 1993;55:1265-72.
- [11] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
- [12] Bugge JF. Brain death and its implications for management of the potential organ donor. *Acta Anaesthesiol Scand* 2009;53:1239-50.
- [13] Ben-Ari Z, Issan Y, Katz Y, Sultan M, Safran M, Michal LS, et al. Induction of heme oxygenase-1 protects mouse liver from apoptotic ischemia/reperfusion injury. *Apoptosis* 2013;18:547-55.
- [14] Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol* 2003;24:449-55.
- [15] Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nat Med* 2011;17:1381-90.
- [16] Kato H, Amersi F, Buelow R, Melinek J, Coito AJ, Ke B, et al. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat livers from ischemia/reperfusion injury with extended cold preservation. *Am J Transplant* 2001;1:121-8.
- [17] Kamo N, Ke B, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. The blockade of IL-1 beta signaling ameliorates liver ischemia and reperfusion injury in mice by inhibiting MAPK signaling. *Am J Transplant* 2012;12:140.
- [18] Hill BG, Dranka BP, Bailey SM, Lancaster JR Jr, Darley-Usmar VM. What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *J Biol Chem* 2010;285:19699-704.
- [19] Abu-Amara M, Yang SY, Seifalian A, Davidson B, Fuller B. The nitric oxide pathway—evidence and mechanisms for

protection against liver ischaemia reperfusion injury. *Liver Int* 2012;32:531–43.

[20] Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg* 2009;22:46–55.

[21] Young CS, Palma JM, Mosher BD, Harkema J, Naylor DF, Dean RE, Crockett E. Hepatic ischemia/reperfusion injury in P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 double-mutant mice. *Am Surg* 2001;67:737–44.

[22] Yago T, Shao B, Miner JJ, Yao L, Klopocki AG, Maeda K, et al. E-selectin engages PSGL-1 and CD44 through a common signaling pathway to induce integrin  $\alpha\text{L}\beta\text{2}$ -mediated slow leukocyte rolling. *Blood* 2010;116:485–94.

[23] Awad EM, Khan SY, Sokolikova B, Brunner PM, Olcaydu D, Wojta J, et al. Cold induces reactive oxygen species production and activation of the NF-kappa B response in endothelial cells and inflammation in vivo. *J Thromb Haemost* 2013;11:1716–26.



## 5. RESULTADOS CLÍNICOS

### 5.1. Resultados clínicos gerais

#### 5.1.1. Resultados precoces – Primeiros 7 dias de pós operatório

Nesta secção foram considerados os elementos que permitiram objectivar e destacar as evoluções menos favoráveis / desfavoráveis, de acordo com os critérios de disfunção precoce do enxerto, conforme definida em Materiais e Métodos (19-22).

No grupo de 54 doentes transplantados:

- 5 (cinco) enxertos tiveram defeito de preservação pelo critério de Howard: quatro enxertos de cadáver (casos 15, 19, 22 e 53) e um enxerto PAF (transplante sequencial, caso 42), em quatro receptores com doença hepática crónica e um receptor em doença PAF.
- 9 (nove) enxertos tiveram disfunção inicial do enxerto, pelos critérios de Ploeg-Maring: oito enxertos de cadáver e um enxerto PAF (transplante sequencial, caso 42), quatro receptores com doença hepática crónica (casos 15, 22, 23, e 53) e quatro receptores com doença PAF (casos 5, 19, 20, 21), sendo dois retransplantes, um em cada grupo (caso 23 e caso 21, respectivamente).
- 15 (quinze) enxertos tiveram critérios de disfunção precoce do enxerto, validados na era do MELD : 13 (treze) enxertos de cadáver (casos 5, 15, 16, 19, 20, 22, 23, 24, 33, 34, 37, 49 e 53) e dois enxerto PAF (transplante sequencial, casos 42 e 51); 10 (dez) receptores com doença hepática crónica (casos 15, 16, 22, 23, 33, 37, 42, 49, 51 e 53) sendo um retransplante (caso 23), 5 (cinco) receptores com doença PAF (casos 5, 19, 20, 24 e 34).

- Não se registou qualquer caso de não funcionamento precoce primário do enxerto (“primary nonfunction”)

Todas as disfunções dos enxertos estão discriminadas, por grupos de receptor, segundo a alocação, na Tabela 1.

**Tabela 1** - Disfunção do enxerto por grupos de receptores segundo a alocação

Classificação	Grupo 1 (n=27)	Grupo 2 (n=15)	Grupo 3 (n=12)	Total
Howard	3	1	1	5
Ploeg – Maring	4	4	1	9
E.A.D.	8	5	2	15
Total (pelo menos um dos três)	8 (29%)	6 (40%)	2 (16%)	16 (29%)

### 5.1.2. Complicações pós operatórias

De acordo com a classificação de Dindo – Clavien (23), registaram-se complicações pós operatórias em 32 doentes, assim escalonados:

- Infecção em 16 casos (parede, líquido ascítico, circulatória, biliar) – grau 2A (casos 1, 7, 9, 10, 11, 22, 23, 27, 29, 33, 39, 40, 41, 49, 53 e 54)
- Disfunção primária do enxerto – 8 casos – grau 2A (casos 5, 15, 19, 20, 22, 34, 42 e 53)
- Reintervenção cirúrgicas – 4 casos – grau 2B (casos 4, 14, 30 e 39)
- Tromboembólicas (T.E.P., A.I.T.) – 2 casos – grau 3A (casos 12 e 52)
- Estenose da anastomose biliar – 1 caso - grau 2B (caso 28)
- Recidiva do vírus C – 1 caso – grau 3B (caso 38)
- Colangite, retransplante e morte – 1 caso - grau 4 (caso 37)
- Rejeições – 1 caso - grau 2A (caso 24)



Todas as disfunções dos enxertos estão discriminadas, por grupos de receptor, segundo a alocação, na Tabela 2.

**Tabela 2** - Complicações (Dindo-Clavien) por grupos de receptores segundo a alocação

<b>Classificação (Dindo-Clavien)</b>	<b>Grupo 1 (n=27)</b>	<b>Grupo 2 (n=15)</b>	<b>Grupo 3 (n=12)</b>	<b>Total (complicações)</b>
I				
II A	12	7	6	25
II B	1	3	2	6
IIIA			1	1
IIIB	1			1
IV	1			1
<b>Total (doentes)</b>	<b>14 (51%)</b>	<b>10 (66%)</b>	<b>8 (66%)</b>	

### 5.1.3. Correlação entre os critérios de disfunção precoce do enxerto e as complicações

Dos 16 enxertos que se incluíram com critérios de disfunção precoce do enxerto (Howard – 4 casos, Ploeg – Maring – 9 casos , ou critérios de disfunção primária e precoce do enxerto validados na era pós MELD – 15 casos) apenas 13 registaram complicações pós operatórias (Dindo – Clavien).

Ao contrário, em três casos que se incluíram nos critérios (Ploeg – Maring – 1 caso, e pós MELD – 2 casos), não se registaram quaisquer complicações pós operatórias.

Dos 32 casos em que se registaram complicações cirúrgicas pós operatórias (Dindo – Clavien), apenas 13 cumpriam um dos critérios de disfunção primária precoce do enxerto.

## 5.2. Resultados clínicos relacionados com as variáveis resposta

### 5.2.1. Disfunção do enxerto

Analisaram-se as variáveis clínicas abaixo discriminadas, em relação à presença de disfunção do enxerto como variável dependente: todos os resultados estão descritos nas Tabelas 3 e 4 (Anexo 3).

Nesta relação de resultados clínicos, não existiu, em nenhuma comparação, significado estatístico. No entanto, as relativas razões de possibilidades (*“Odds Ratio”*) revelaram diferenças relevantes, em face da amostra (n = 54).

**GRUPO POR ALOCAÇÃO** - A análise referente ao **grupo do receptor por alocação**, revelou uma razão de possibilidades de 2.078 do grupo 2 (enxerto de cadáver em receptor com PAF) relativamente ao grupo 1 (enxerto de cadáver em receptor com cirrose), e de 0.216 do grupo 3 (enxerto PAF em receptor cirrótico) relativamente ao grupo 1: no grupo 2 houve mais do dobro de possibilidades de se verificar disfunção do enxerto que no grupo 1, e no grupo 3 houve menos de metade da mesma possibilidade que no grupo 1.

**GÉNERO DO RECEPTOR** – A análise referente ao **género do receptor**, revelou uma razão de possibilidades de 0.313 (masculino) e 3.200 (feminino): nos receptores do género masculino houve cerca de 3 vezes menos possibilidades de se verificar disfunção do enxerto.

**ISQUÉMIA FRIA** - A análise referente ao **tempo de isquémia fria**, revelou uma razão de possibilidades de 1.9 dos enxertos com mais de **500 minutos**: nos receptores de enxertos com isquémia fria superior àquele tempo houve o dobro de possibilidades de se verificar disfunção do enxerto.

**ISQUÉMIA QUENTE** – A análise referente ao **tempo de isquémia quente**, revelou uma razão de possibilidades de 2.100 e de 5.600, respectivamente para tempos

superiores **a 60 e a 90 minutos**: nos receptores em que o tempo das anastomoses venosas foi superior a **90 minutos**, a possibilidade de se verificar disfunção do enxerto duplicou, passando a ser mais de cinco vezes superior se o mesmo tempo exceder os 90 minutos.

**COMPLICAÇÕES (DINDO – CLAVIEN)** – A análise referente à existência de complicações, revelou uma razão de possibilidades de 3.900: nos receptores em que se registaram complicações no pós operatório, a possibilidade coexistir disfunção do enxerto foi cerca de 4 vezes superior em relação aos receptores sem complicações.

**DIAS DE U.C.I.** - A análise referente ao número de dias na U.C.I., revelou uma razão de possibilidades de 7.500 para internamentos superiores a **6 dias**, em relação aos inferiores a 4 dias: nos receptores que permaneceram mais de seis dias na U.C.I. houve uma possibilidade, superior a sete vezes, de se verificar disfunção do enxerto, relativamente aos receptores em que esse internamento foi inferior a **4 dias**.

**TEMPO OPERATÓRIO** – A análise referente ao **tempo operatório** revelou uma razão de possibilidades de 2.500 para tempos superiores a 350 minutos: nos receptores em que o tempo operatório excedeu 350 minutos, a possibilidade de disfunção do enxerto mais que duplicou.

**PONTUAÇÃO HISTOLÓGICA** - A análise referente à **pontuação histológica** revelou uma razão de possibilidades de 4.455 e de 7.000, respectivamente para pontuações **entre 2 e 5 e superiores a 10**, em relação às pontuações inferiores a 2: nos enxertos com lesões histológicas entre 2 e 5, houve mais de 4 vezes a possibilidade de se verificar disfunção relativamente àqueles em que a pontuação foi inferior a 2; nos enxertos em que a pontuação foi superior a 10, a mesma possibilidade relativa aumentou para 7 vezes.

**DIAGNÓSTICO P.A.F. NO RECEPTOR** – A análise referente ao diagnóstico do receptor (**PAF versus não PAF**), revelou uma razão de possibilidades de 2.917: nos receptores com doença PAF, a possibilidade de se verificar disfunção do enxerto foi cerca de três vezes maior, relativamente aos receptores com outros diagnósticos.

### 5.2.2. Complicações (Dindo – Clavien)

Analisaram-se as variáveis clínicas abaixo discriminadas, em relação à presença de complicações (Dindo – Clavien) como variável dependente: todos os resultados estão descritos nas Tabelas 6, 7 e 8 (Anexo 3).

Nesta relação de resultados clínicos, existiu significado estatístico na razão de possibilidades relativamente ao **sexo masculino**, na análise multivariável ( $p=0.023$ ), e relativamente ao tempo de isquemia fria superior a 500 minutos, na análise univariável ( $p=0.014$ ).

Para além destas variáveis, há a referir, pela sua relevância numérica nesta comparação:

- o **número de reinternamentos igual ou superior a 2**, com uma razão de possibilidades de 5.17 na análise multivariável, e de 3.90 na análise univariável,
- a **disfunção do enxerto**, com uma razão de possibilidades de 3.90, na análise univariável.

### 5.2.3. Número de reinternamentos igual ou superior a dois

Analisaram-se as variáveis clínicas abaixo discriminadas, em relação ao número de reinternamentos igual ou superior a 2, como variável dependente: todos os resultados estão descritos nas tabelas 9, 10 e 11.

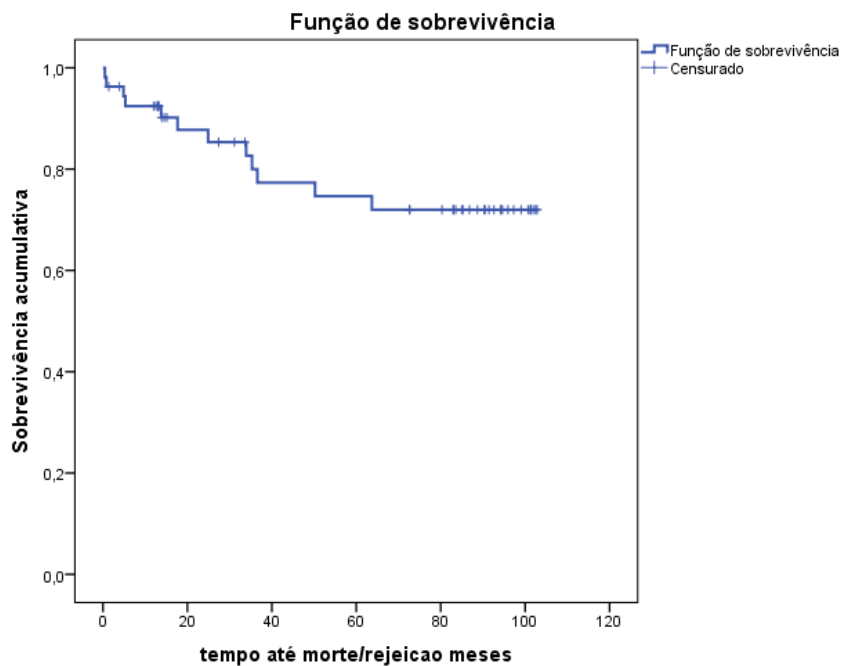
Nesta relação de resultados clínicos, não existiu qualquer valor com significado estatístico, referindo-se:

- para a variável **dias de internamento** uma razão de possibilidades de 1.11 com  $p=0.048$  na análise multivariável e de 1.1 com  $p=0.048$  na análise multivariável,
- para a variável **complicações** uma razão de possibilidades de 3.9 com  $p=0.058$  na análise multivariável.

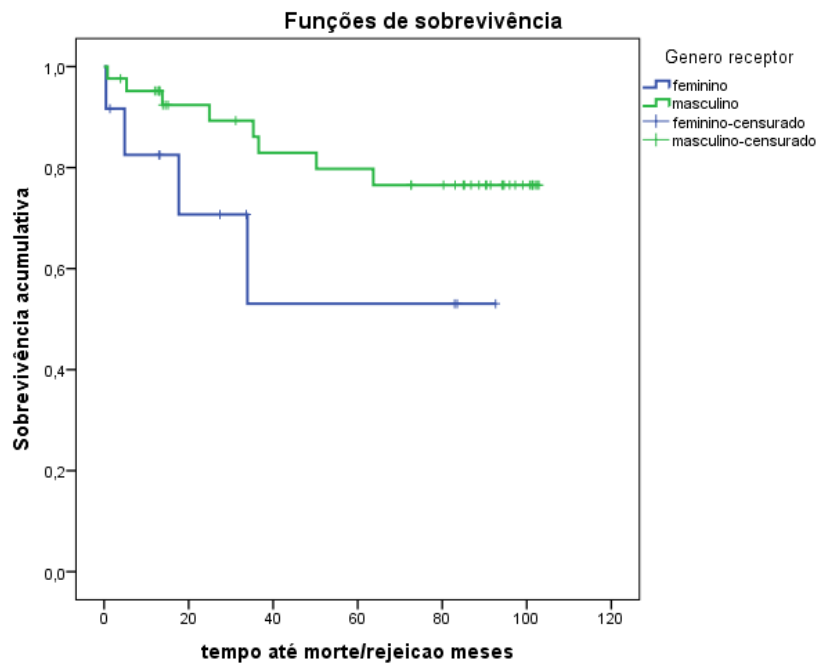
#### 5.2.4. Tempo decorrido até à morte do receptor ou rejeição crónica do enxerto

Analisaram-se as variáveis clínicas abaixo discriminadas, em relação ao tempo decorrido até à morte do receptor ou rejeição crónica do enxerto, como variável dependente: todos os resultados estão descritos nas Tabelas 12 e 13 (Anexo 3). A sobrevivência global dos doentes (n=54), e a sobrevivência por género do receptor, podem observar-se nas Figuras 1 e 2.

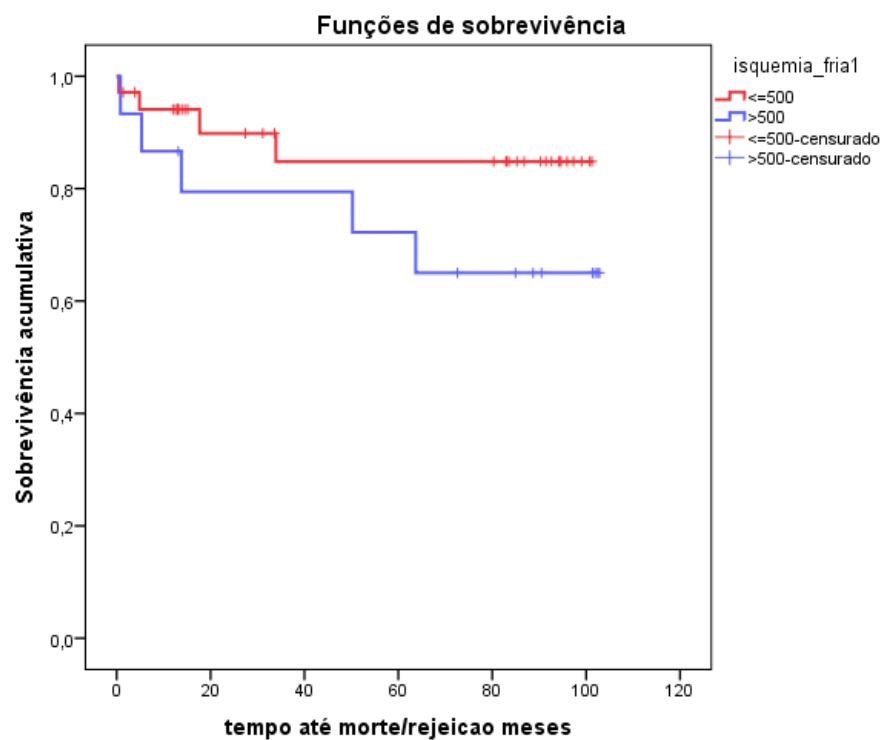
Os gráficos de sobrevivência são apresentados, relativamente ao género do receptor (Figura 2), tempo de isquémia fria (Figura 3), complicações (Figura 4), disfunção do enxerto (Figura 5), diagnóstico de PAF do receptor (Figura 6), e reinternamentos (Figura 7).



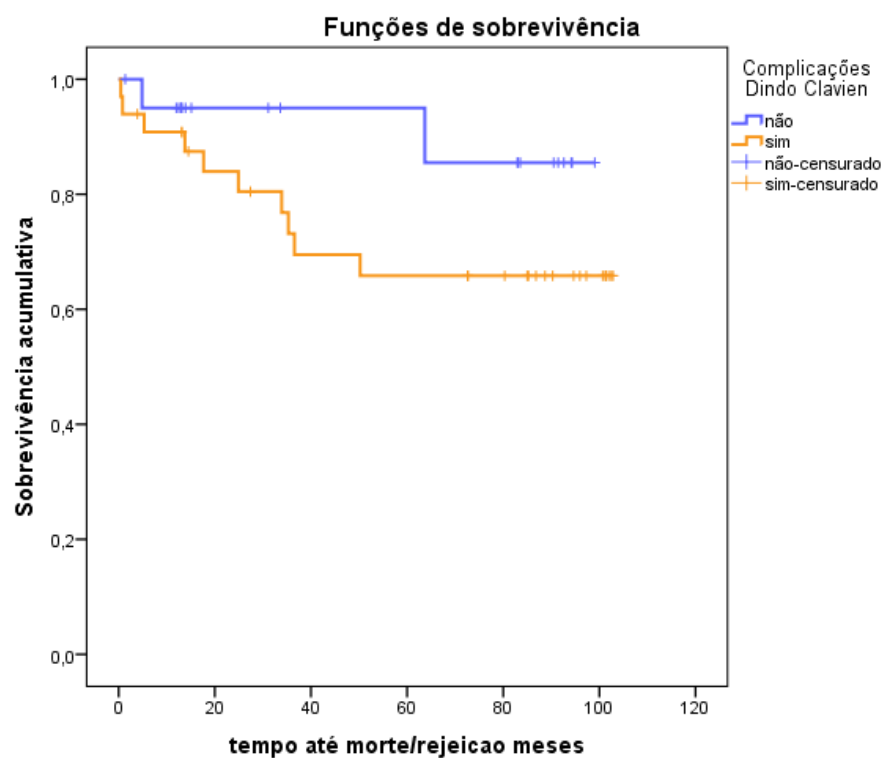
**Figura 1** - Sobrevivência global dos 54 doentes.



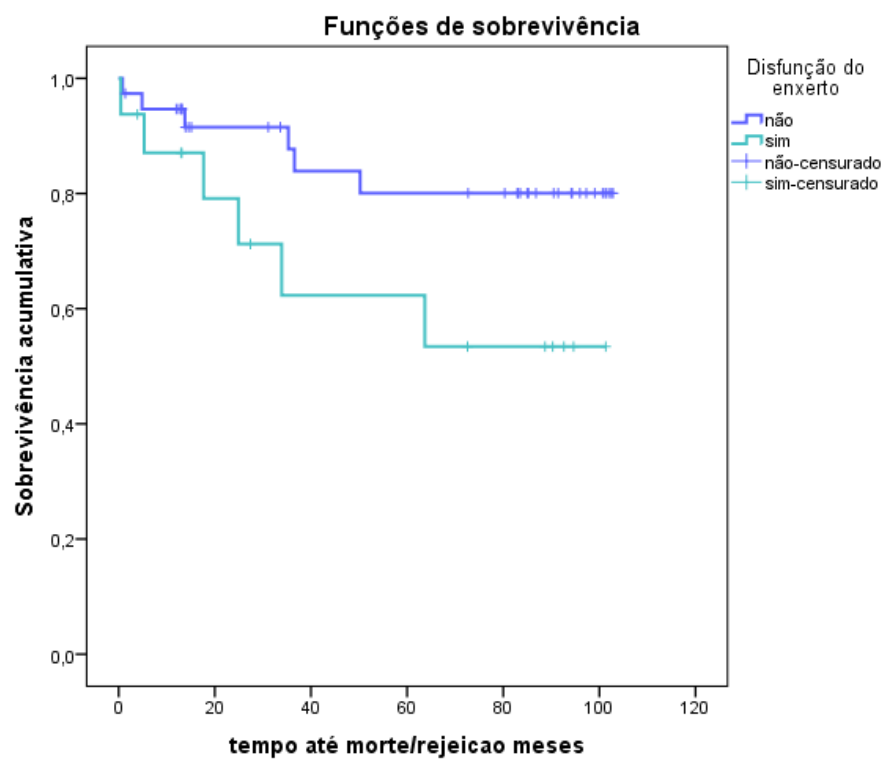
**Figura 2** - Sobrevivência dos 54 doentes por género do receptor.



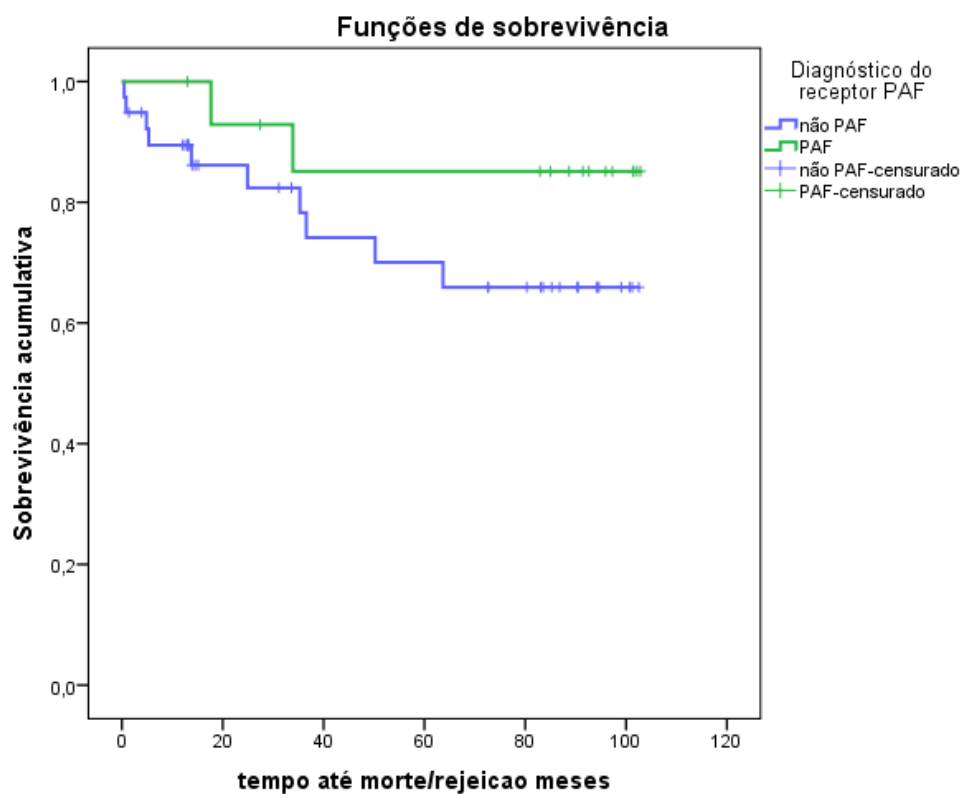
**Figura 3** - Sobrevivência dos 54 doentes por tempo de isquémia fria.



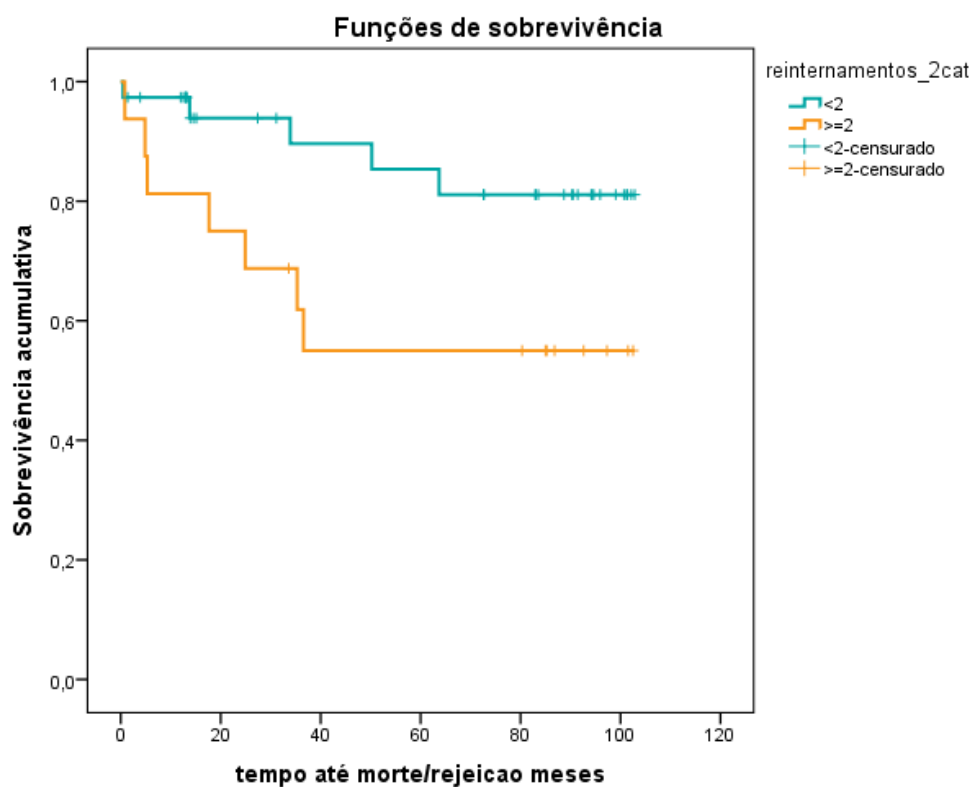
**Figura 4** - Sobrevivência dos 54 doentes por complicações (Dindo – Clavien).



**Figura 5** - Sobrevivência dos 54 doentes por disfunção do enxerto.



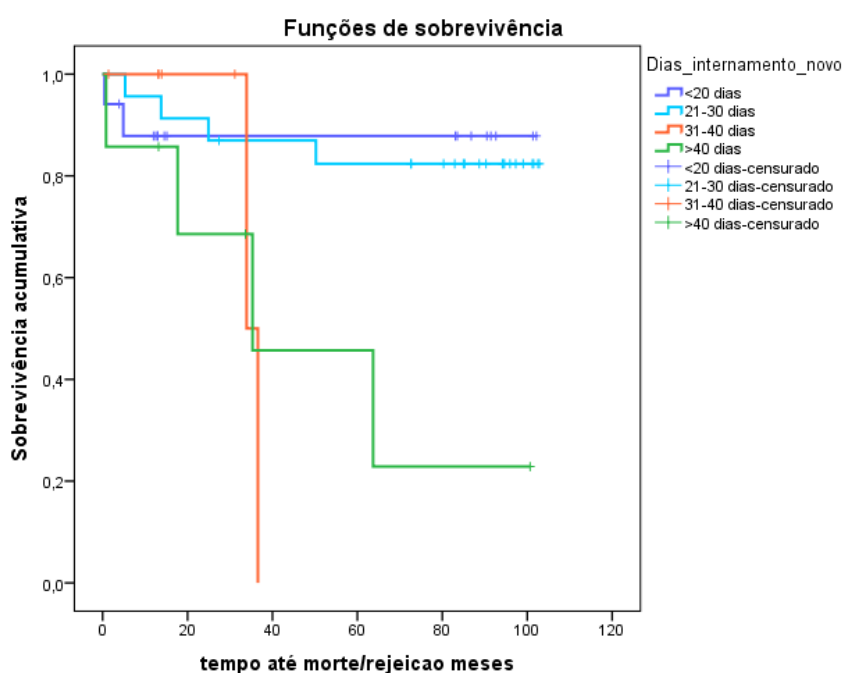
**Figura 6** - Sobrevivência dos 54 doentes por diagnóstico de PAF.



**Figura 7** - Sobrevivência dos 54 doentes por reinternamentos.



Nesta relação de resultados clínicos, existiu significado estatístico o valor da variável **dias de internamento** ( $p=0.004$ ), na análise multivariável e na univariável ( $p=0.001$ ) – Figura 8; refere-se, ainda, na análise univariável, as variáveis **complicações** e **disfunção do enxerto**, com razões de possibilidades e valores de  $p$ , respectivamente de 2.74, 2.77, 0.193 e 0.078.



**Figura 8** - Sobrevivência dos 54 doentes por dias do primeiro internamento.

### 5.3. Resultados laboratoriais relacionados com as variáveis resposta

#### 5.3.1. Disfunção do enxerto

Analísaram-se as variáveis laboratoriais abaixo descritas, em relação à presença de disfunção do enxerto como variável dependente: todos os resultados estão descritos nas Tabelas 15 e 16 (Anexo 3).

Na relação de resultados laboratoriais histológicos, não existiu, em nenhuma comparação, significado estatístico. No entanto, as relativas razões de possibilidades (“*Odds Ratio*”) revelaram diferenças relevantes, em face da amostra (n = 54).

**BALONIZAÇÃO NAS BIÓPSIAS EM T0 E T1** - A análise referente à presença de balonização nas biopsias em T0 e T1, revelou uma razão de possibilidades respectivamente de 3.5 e 7.5 relativamente às que não evidenciavam esta lesão: os enxertos em que se detectou balonização nas biopsias em T0 e em T1 demonstraram uma possibilidade maior de terem disfunção, respectivamente 3.5 e 7.5 vezes mais, que os enxertos sem esta lesão.

**NECROSE NAS BIÓPSIAS EM T0 E T1** – A análise referente à presença de necrose nas biopsias em T0 e T1, revelou uma razão de possibilidades respectivamente de 3.2 e de 2.3 relativamente às que não evidenciaram esta lesão: os enxertos em que se detectou necrose nas biopsias em T0 e em T1 demonstraram uma possibilidade maior de terem disfunção, respectivamente 3.2 e 2.3 vezes mais, que os enxertos sem esta lesão.

Nas relações de **resultados laboratoriais moleculares** (Mann-Whitney), existiu uma comparação com significado estatístico ( $p = 0.013$ , SELE em T0) e outra com evidência de diferença ( $p = 0.028$ , IL  $1\beta$  em T0). Pelo resultado da análise multivariável, a expressão de SELE em T0 revelou  $p=0.030$ .

**EXPRESSÃO DE SELECTINA E EM T0** – A análise multivariável referente à expressão de Selectina E na biopsia no início da colheita multiorgânica (T0), revelou uma razão de possibilidades de 1.93 nos casos de maior expressão relativamente aos de menor expressão ( $p=0.030$ ): a disfunção do enxerto foi 1.93 vezes mais provável nos casos com expressão alta de SELE na biopsia T0 que nos casos de expressão baixa.

**EXPRESSÃO DE INTERLEUCINA 1 BETA EM T0** – A análise univariável referente à expressão de Interleucina  $1\beta$  na biopsia no início da colheita multiorgânica (T0) segundo a disfunção do enxerto, revelou uma maior probabilidade de se verificar

aquela variável nos casos de maior expressão relativamente aos de menor expressão ( $p=0.028$ ).

### 5.3.2. Complicações (Dindo – Clavien)

Analysaram-se as variáveis laboratoriais abaixo discriminadas, em relação à presença de complicações (Dindo – Clavien) como variável dependente: todos os resultados estão descritos nas Tabelas 18 e 19 (Anexo 3).

Nas relações de **resultados laboratoriais moleculares ou histológicos**, não existiu qualquer comparação com significado estatístico ou outra com evidência de diferença, tanto pela análise univariável como multivariável.

### 5.3.3. Número de reinternamentos igual ou superior a dois

Analysaram-se as variáveis laboratoriais abaixo discriminadas, em relação ao número de reinternamentos igual ou superior a 2 como variável dependente: todos os resultados estão descritos nas Tabelas 20 e 21 (Anexo 3).

Nas relações de **resultados laboratoriais moleculares ou histológicos**, não existiu qualquer comparação com significado estatístico, tanto pela análise univariável como multivariável. Registou-se evidência de diferença, tanto na análise univariável como multivariável, para o valor de Granzima B em T0 (razão de possibilidades de 0.43,  $p=0.073$ ) e de esteatose (razão de possibilidades de 0.05,  $p=0.036$ )

### 5.3.4. Tempo decorrido até à morte do receptor ou rejeição crónica do enxerto

Analysaram-se as variáveis laboratoriais abaixo discriminadas, em relação ao tempo decorrido até à morte do receptor ou rejeição crónica do enxerto como variável dependente: todos os resultados estão descritos nas Tabelas 22 e 23 (Anexo 3).

Nas relações de **resultados laboratoriais moleculares**, não existiu qualquer comparação com significado estatístico, tanto pela análise univariável como multivariável, existindo evidência de diferença para o valor de **Fasligando em T0** (razão de possibilidades de 1.48, com  $p=0.079$ ) na análise multivariável.

Nas relações de **resultados laboratoriais histológicos**, existiu uma comparação com significado estatístico ( $p=0.004$ ) relativamente à **esteatose**, com razão de possibilidades de 0.08 na análise multivariável.

## Referências

1. Aggarwal S, Kang Y, Freeman JA, Fortunato FL, Pinsky MR. Postreperfusion syndrome: cardiovascular collapse following hepatic reperfusion during liver transplantation. Transplantation proceedings. 1987;19(4 Suppl 3):54-5.
2. Furtado A, Tome L, Oliveira FJ, Furtado E, Viana J, Perdigoto R. Sequential liver transplantation. Transplantation proceedings. 1997;29(1-2):467-8.
3. Bispo M, Marcelino P, Marques HP, Martins A, Perdigoto R, Aguiar MJ, et al. Domino versus deceased donor liver transplantation: association with early graft function and perioperative bleeding. Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society. 2011;17(3):270-8.
4. Reichert B, Becker T, Weismuller TJ, Kleine M, Zachau L, Johanning K, et al. Value of the preoperative SOFT-score, P-SOFT-score, SALT-score and labMELD-score for the prediction of short-term patient and graft survival of high-risk liver transplant recipients with a pre-transplant labMELD-score  $\geq 30$ . Annals of transplantation : quarterly of the Polish Transplantation Society. 2012;17(2):11-7.
5. Starzl TE, Miller C, Broznick B, Makowka L. An improved technique for multiple organ harvesting. Surgery, gynecology & obstetrics. 1987;165(4):343-8.
6. Suzuki S, Toledo-Pereyra LH, Rodriguez FJ, Cevalvo D. Neutrophil infiltration as an important factor in liver ischemia and reperfusion injury. Modulating effects of FK506 and cyclosporine. Transplantation. 1993;55(6):1265-72.
7. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C(T)$ ) Method. Methods. 2001;25(4):402-8.
8. Ben-Ari Z, Issan Y, Katz Y, Sultan M, Safran M, Michal LS, et al. Induction of heme oxygenase-1 protects mouse liver from apoptotic ischemia/reperfusion injury. Apoptosis : an international journal on programmed cell death. 2013;18(5):547-55.
9. Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. Trends in immunology. 2003;24(8):449-55.

10. Phillipson M, Kubes P. The neutrophil in vascular inflammation. *Nature medicine*. 2011;17(11):1381-90.
11. Kato H, Amersi F, Buelow R, Melinek J, Coito AJ, Ke B, et al. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat livers from ischemia/reperfusion injury with extended cold preservation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2001;1(2):121-8.
12. Kamo N, Ke B, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW. The blockade of IL-1 beta signaling ameliorates liver ischemia and reperfusion injury in mice by inhibiting MAPK signaling. *Am J Transplantation*. 2012;12:140.
13. Hill BG, Dranka BP, Bailey SM, Lancaster JR, Jr., Darley-Usmar VM. What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(26):19699-704.
14. Abu-Amara M, Yang SY, Seifalian A, Davidson B, Fuller B. The nitric oxide pathway--evidence and mechanisms for protection against liver ischaemia reperfusion injury. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2012;32(4):531-43.
15. Shimamura T, Zhu Y, Zhang S, Jin MB, Ishizaki N, Urakami A, et al. Protective role of nitric oxide in ischemia and reperfusion injury of the liver. *Journal of the American College of Surgeons*. 1999;188(1):43-52.
16. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*. 2009;22(1):46-55.
17. Young CS, Palma JM, Mosher BD, Harkema J, Naylor DF, Dean RE, et al. Hepatic ischemia/reperfusion injury in P-selectin and intercellular adhesion molecule-1 double-mutant mice. *The American surgeon*. 2001;67(8):737-44.
18. Awad EM, Khan SY, Sokolikova B, Brunner PM, Olcaydu D, Wojta J, et al. Cold induces reactive oxygen species production and activation of the NF-kappa B response in endothelial cells and inflammation in vivo. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2013;11(9):1716-26.
19. Howard TK, Klintmalm GB, Cofer JB, Husberg BS, Goldstein RM, Gonwa TA. The influence of preservation injury on rejection in the hepatic transplant recipient. *Transplantation*. 1990;49(1):103-7.
20. Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM, et al. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation--a multivariate analysis. *Transplantation*. 1993;55(4):807-13.
21. Maring JK, Klompmaker IJ, Zwaveling JH, Kranenburg K, Ten Vergert EM, Slooff MJ. Poor initial graft function after orthotopic liver transplantation: can it be predicted and does it affect outcome? An analysis of 125 adult primary transplantations. *Clinical transplantation*. 1997;11(5 Pt 1):373-9.
22. Olthoff KM, Kulik L, Samstein B, Kaminski M, Abecassis M, Emond J, et al. Validation of a current definition of early allograft dysfunction in liver transplant recipients and analysis of risk factors. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the*

Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society. 2010;16(8):943-9.

23. Dindo D, Demartines N, Clavien PA. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Annals of surgery*. 2004;240(2):205-13.

### ANEXO 3 - Tabelas de análises para as variáveis resposta

**Tabela 3.** Análise univariável para a variável resposta disfunção do enxerto

Variáveis	O.R.	95% C.I.	Valor de p*
<b>Grupo (por alocação)</b>			
1 vs 2	2.078	0.562 – 7.688	0.273
1 vs 3	0.216	0.024 – 1.963	0.174
<b>Género (receptor)</b>			
Masculino	0.313	0.082 – 1.189	0.088
Feminino	3.200	0.841 – 12.171	0.088
<b>Idade (dador)</b>			
>50	0.900	0.155 – 5.216	0.906
<50	1.111	0.192 – 6.440	0.906
<b>Isquémia fria &gt; 500</b>	1.926	0.535 – 6.936	0.316
<b>Isquémia quente</b>			
> 60 < 90 vs < 60	2.100	0.399 – 11.066	0.382
> 90 vs < 60	5.600	0.457 – 68.68	0.178
<b>Complicações (Dindo – Clavien)</b>	3.900	0.954 – 15.937	0.058
<b>SOFT</b>			
<b>Low-mod. vs Low</b>	0.964	0.212 – 4.382	0.962
<b>High-mod. vs. Low</b>	0.563	0.057 – 5.579	0.623
<b>Dias de UCI</b>			
4-6 dias vs < 4 dias	0.795	0.223 – 2.840	0.725
> 6 dias vs < 4 dias	7.500	0.645 – 87.193	0.107
<b>Dias de internamento</b>			
21-30 dias vs < 20 dias	1.050	0.267 – 4.133	0.944
31-40 dias vs < 20 dias	0.960	0.137 – 6.704	0.967
> 40 dias vs < 20 dias	0.960	0.137 – 6.704	0.967
<b>Tempo operatório &gt; 350</b>	2.500	0.735 – 8.502	0.142
<b>Score Anat. Patol.</b>			
2 a 5 vs < 2	4.455	0.477 – 44.413	0.203
6 a 9 vs < 2	1.400	0.123 – 15.974	0.786
> 10 vs < 2	7.000	0.613 – 79.871	0.117
<b>Diag. PAF (receptor)</b>	2.917	0.829 – 10.267	0.095
<b>Reinternamentos</b>			
2-3 vs < 2	0.929	0.204 – 4.227	0.924
>3 vs < 2	0.433	0.046 – 4.125	0.467

Legenda da Tabela 3 – OR (Odds Ratio); IC (Intervalo de confiança); UCI (Unidade de Cuidados Intensivos); \*valor p resultante do modelo de regressão logística.

**Tabela 4.** Análise univariável das características demográficas e clínicas da variável resposta disfunção do enxerto

Variáveis	Todos doentes (54)	Doentes sem disfunção do enxerto	Doentes com disfunção do enxerto	Valor p*
Idade do receptor Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> ) (anos)	48.5 (30.8-57.0)	51.0 (31.8-57.3)	44.5 (29.0-54.8)	0.366
Idade do dador Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> ) (anos)	33.0 (27.0-47.3)	33.0 (27.0-47.0)	38.0 (30.0-48.0)	0.757
Tempo de isquemia fria Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> ) (min)	443.0 (360.0-547.0)	420.0 (360.0-540.0)	470.0 (390.0-605.0)	0.128
Tempo de isquemia quente Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> ) (min)	50.0 (41.3-55.0)	50.0 (40.0-55.0)	55.0 (45.0-60.0)	0.168
Dias em UCI Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )	4.0 (3.0-5.0)	4.0 (3.0-5.0)	4.0 (3.0-5.8)	0.192
Dias de internamento Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )	24.0 (17.0-31.0)	25.0 (17.8-31.0)	23.5 (13.5-29.3)	0.559
Tempo operatório Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> ) (min)	330.0 (300.0-370.0)	330.0 (300.0-360.0)	345.0 (281.3-427.5)	0.124
Score de histologia Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )	6.0 (3.3-9.0)	7.0 (3.0-8.5)	5.0 (4.0-12.0)	0.316
Número de reinternamentos Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )	1.0 (0.0-2.0)	1.0 (0.0-2.0)	1.0 (0.0-1.8)	0.366
MELD Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )	15.0 (10.3-19.5)	16.0 (10.0-18.5)	11.5 (10.0-32.8)	0.335
Score Bar Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )	14.0 (2.0-7.3)	5.0 (2.0-7.3)	2.5 (2.0-7.8)	0.944

Legenda da Tabela 4 – MELD (Model for End Stage Liver Disease); Bar (Balance of Risk); min (minutos); \*valor p resultante da comparação das características demográficas e clínicas entre os grupos de doentes com e sem disfunção do enxerto através do modelo de regressão logística.

**Tabela 5.** Resultado da análise multivariável para a variável resposta disfunção do enxerto

Variáveis	OR	IC 95%	Valor p*
<b>Género Masculino</b>	0.13	0.01-0.25	0.077
<b>Isquémia fria (min)</b>	1.74	0.95-3.18	0.074
<b>Isquémia quente (min)</b>	1.64	0.91-2.94	0.099
<b>SELE no T0</b>	<b>1.93</b>	1.06-3.50	<b>0.030</b>

Legenda da Tabela 5 – OR (Odds Ratio); IC (Intervalo de confiança); min (minutos); \*valor p resultante do modelo de regressão logística



**Tabela 6.** Análise univariável para a variável resposta complicação Dindo-Calvien

Variáveis	OR	IC 95%	Valor p*
<b>Grupo</b> (referência Cadáver para Cirrótico)			
Cadáver para PAF	2.55	0.65-10.06	0.180
PAF para Cirrótico	1.86	0.45-7.67	0.392
<b>Gênero</b> (referência Feminino)			
Masculino	4.46	1.14-17.50	0.032
<b>Idade dador</b> (referência>50 anos)			
≤50 anos	3.08	0.63-14.98	0.164
<b>Isquemia fria</b> (referência≤500m)			
>500m	7.72	1.51-39.42	0.014
<b>Isquemia quente</b> (referência<60m)			
60-90m	1.08	0.21-5.50	0.927
>90m	1.62	0.14-19.41	0.704
<b>Disfunção do enxerto</b>	3.90	0.95-15.94	0.058
<b>SOFT</b> (risco alto-moderado)			
Risco baixo	0.36	0.04-3.52	0.379
Risco baixo-moderado	0.38	0.03-4.71	0.447
<b>Dias UCI</b> (referência<4dias)			
4-6 dias	2.02	0.63-6.46	0.236
>6 dias	0.91	0.11-7.72	0.930
<b>Dias internamento</b> (referência<21dias)			
21-30 dias	8.71	2.01-37.76	0.004
31-40 dias	2.44	0.41-14.75	0.330
>40 dias	2.44	0.41-14.75	0.330
<b>Tempo operatório</b> (referência≤350m)			
>350m	0.81	0.25-2.60	0.726
<b>Score anatomia</b> (referência 6 ou mais)			
0-5	1.95	0.64-5.95	0.241
<b>Diagnostico receptor PAF</b>	2.13	0.58-7.86	0.259
<b>Reinternamento</b> (referência<2)			
≥2	3.90	0.95-15.94	0.058

Legenda da Tabela 6 – OR (Odds Ratio); IC (Intervalo de confiança); UCI (Unidade de Cuidados Intensivos); \*valor p resultante do modelo de regressão logística.

**Tabela 7.** Análise univariável das características demográficas e clínicas da variável resposta complicação Dindo-Calvien

Variáveis	Todos doentes (54)	Doentes sem complicação Dindo-Calvien	Doentes com complicação Dindo-Calvien	Valor p*
Idade do receptor Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> ) (anos)	48.5 (30.8-57.0)	48.0 (28.5-57.0)	50.0 (34.5-57.5)	0.380
Idade do dador Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> ) (anos)	33.0 (27.0-47.3)	33.0 (25.5-54.0)	32.0 (27.5-40.0)	0.305
Tempo de isquemia fria Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> ) (min)	443.0 (360.0-547.0)	420.0 (332.5-480.0)	467.0 (367.5-597.5)	0.028
Tempo de isquemia quente Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> ) (min)	50.0 (41.3-55.0)	50.0 (45.0-55.0)	45.0 (40.0-57.0)	0.824
Dias em UCI Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )	4.0 (3.0-5.0)	4.0 (3.0-4.0)	4.0 (3.0-5.5)	0.982
Dias de internamento Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )	24.0 (17.0-31.0)	18.0 (15.0-31.0)	25.0 (21.0-30.5)	0.270
Tempo operatório Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> ) (min)	330.0 (300.0-370.0)	330.0 (292.5-365.0)	330.0 (295.0-375.0)	0.353
Score de anatomia Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )	6.0 (3.3-9.0)	7.5 (4.0-10.0)	5.0 (3.0-8.0)	0.164
Número de reinternamentos Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )	1.0 (0.0-2.0)	1.0 (0.0-1.0)	1.0 (0.0-2.0)	0.090
MELD Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )	15.0 (10.3-19.5)	16.0 (9.8-21.3)	13.0 (10.8-17.0)	0.920
Score Bar Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )	14.0 (2.0-7.3)	4.0 (2.0-9.0)	5.0 (2.0-7.0)	0.817

Legenda da Tabela 7 – MELD (Model for End Stage Liver Disease); Bar (Balance of Risk); min (minutos);

\*valor p resultante da comparação das características demográficas e clínicas entre os grupos de doentes com e sem complicação Dindo-Calvien através do modelo de regressão logística.

**Tabela 8.** Resultado da análise multivariável para a variável resposta complicação Dindo-Calvien

Variáveis	OR	IC 95%	Valor p*
<b>Género Masculino</b>	5.89	1.28-27.05	0.023
<b>Reinternamento ≥ 2</b>	5.17	1.08-24.72	0.040

Legenda da Tabela 8 – OR (Odds Ratio); IC (Intervalo de confiança); min (minutos); \*valor p resultante do modelo de regressão logística

**Tabela 9.** Análise univariável para a variável resposta reinternamento igual ou superior a 2

Variáveis	OR	IC 95%	Valor p*
<b>Grupo</b> (referência Cadáver para Cirrótico)			
Cadáver para PAF	1.75	0.43-7.14	0.435
PAF para Cirrótico	2.50	0.58-10.80	0.220
<b>Gênero</b> (referência Feminino)			
Masculino	0.80	0.20-3.16	0.750
<b>Idade dador</b> (referência>50 anos)			
≤50 anos	1.63	0.29-9.23	0.584
<b>Isquemia fria</b> (referência≤500m)			
>500m	1.69	0.45-6.40	0.441
<b>Isquemia quente</b> (referência<60m)			
60-90m	1.29	0.21-7.82	0.783
>90m	1.61	0.13-19.91	0.710
<b>Complicações Dindo-Clavien</b>	3.90	0.95-15.94	0.058
<b>Disfunção do enxerto</b>	0.72	0.19-2.71	0.630
<b>SOFT</b> (risco alto-moderado)			
Risco baixo	0.07	0.01-0.66	0.021
Risco baixo-moderado	0.17	0.01-2.09	0.165
<b>Dias UCI</b> (referência<4dias)			
4-6 dias	1.17	0.31-4.40	0.820
>6 dias	0.67	0.12-3.86	0.651
<b>Dias internamento</b> (referência<21dias)			
21-30 dias	2.49	0.55-11.31	0.238
31-40 dias	0.78	0.07-9.08	0.841
>40 dias	6.22	0.89-43.66	0.066
<b>Tempo operatório</b> (referência≤350m)			
>350m	1.03	0.28-3.71	0.969
<b>Score anatomia</b> (referência 6 ou mais)			
0-5	1.59	0.49-5.15	0.441
<b>Diagnostico receptor PAF</b>	1.27	0.35-4.58	0.712

Legenda da Tabela 9 – OR (Odds Ratio); IC (Intervalo de confiança); UCI (Unidade de Cuidados Intensivos); \*valor p resultante do modelo de regressão logística.

**Tabela 10.** Análise univariável das características demográficas e clínicas da variável resposta reinternamento igual ou superior a 2

Variáveis	Todos doentes (54)	Doentes com menos de 2 reinternamentos	Doentes com 2 ou mais reinternamentos	Valor p*
Idade do receptor Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> ) (anos)	48.5 (30.8-57.0)	48.5 (30.8-57.0)	49.0 (30.3-58.8)	1.000
Idade do dador Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> ) (anos)	33.0 (27.0-47.3)	32.0 (27.0-48.0)	36.0 (27.0-47.0)	0.843
Tempo de isquemia fria Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> ) (min)	443.0 (360.0-547.0)	441.0 (360.0-538.0)	445.0 (383.0-602.0)	0.323
Tempo de isquemia quente Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> ) (min)	50.0 (41.3-55.0)	50.0 (45.0-55.0)	47.5 (40.0-58.8)	0.889
Dias em UCI Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )	4.0 (3.0-5.0)	4.0 (3.0-5.3)	3.5 (3.0-5.0)	0.335
Dias de internamento Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )	24.0 (17.0-31.0)	21.5 (15.8-30.3)	28.0 (22.0-38.5)	0.075
Tempo operatório Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> ) (min)	330.0 (300.0-370.0)	330.0 (277.5-365.0)	322.5 (300.0-392.5)	0.401
Score de anatomia Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )	6.0 (3.3-9.0)	6.5 (4.0-9.0)	5.0 (2.3-9.0)	0.786
MELD Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )	15.0 (10.3-19.5)	13.0 (10.0-21.3)	16.0 (11.3-17.0)	0.766
Score Bar Mediana (P <sub>25</sub> -P <sub>75</sub> )	14.0 (2.0-7.3)	3.5 (2.0-8.0)	5.0 (2.0-7.0)	0.702

Legenda da Tabela 10 – MELD (Model for End Stage Liver Disease); Bar (Balance of Risk); min (minutos); \*valor p resultante da comparação das características demográficas e clínicas entre doentes com menos de 2 reinternamentos e com 2 ou mais reinternamentos através do modelo de regressão logística.

**Tabela 11.** Resultado da análise multivariável para a variável resposta reinternamento igual ou superior a 2 dias

Variáveis	OR	IC 95%	Valor p*
<b>Dias de internamento</b>	1.11	1.00-1.22	0.048
<b>GRB no T0</b>	0.43	0.17-1.08	0.073
<b>Esteatose T1</b>	0.05	0.01-0.82	0.036

Legenda da Tabela 11 – OR (Odds Ratio); IC (Intervalo de confiança); min (minutos); \*valor p resultante do modelo

**Tabela 12.** Análise univariável do tempo até à morte ou rejeição crónica do enxerto

Variáveis	HR	IC 95%	Valor p*
<b>Grupo</b> (referência Cadáver para Cirrótico)			
Cadáver para PAF	0.37	0.08-1.78	0.215
PAF para Cirrótico	0.89	0.23-3.51	0.886
<b>Gênero</b> (referência Feminino)			
Masculino	0.36	0.11-1.22	0.102
<b>Idade do receptor</b>	1.03	0.99-1.08	0.148
<b>Idade dador</b>	0.99	0.94-1.04	0.587
<b>Idade dador</b> (referência>50 anos)			
≤50 anos	1.59	0.20-12.71	0.665
<b>Isquémia fria</b> (referência≤500m)			
>500m	2.49	0.67-9.30	0.176
<b>Isquémia fria</b>	1.21	0.85-1.72	0.291
<b>Isquémia quente</b> (referência<60m)			
60-90m	0.88	0.10-7.53	0.905
>90m	2.31	0.27-19.82	0.445
<b>Isquémia quente</b>	1.06	0.74-1.53	0.741
<b>Complicações Dindo-Clavien</b>	2.74	0.60-12.54	0.193
<b>Disfunção do enxerto</b>	2.77	0.89-8.62	0.078
<b>SOFT</b> (risco alto-moderado)			
Risco baixo	0.55	0.12-2.55	0.445
Risco baixo-moderado	0.28	0.03-3.14	0.305
<b>Dias UCI</b> (referência<4dias)			
4-6 dias	0.42	0.12-1.48	0.176
>6 dias	2.22	0.44-11.10	0.332
<b>Dias UCI</b>	1.07	0.99-1.15	0.092
<b>Dias internamento</b> (referência<21dias)			
21-30 dias	0.95	0.17-5.22	0.956
31-40 dias	3.98	0.54-29.60	0.177
>40 dias	5.25	0.95-28.90	0.057
<b>Dias internamento</b>	1.04	1.02-1.07	0.001
<b>Tempo operatório</b> (referência≤350m)			
>350m	0.50	0.10-2.39	0.382
<b>Tempo operatório</b>	1.00	0.99-1.01	0.987
<b>MELD</b>	0.96	0.82-1.11	0.561
<b>Score Bar</b>	1.00	0.86-1.16	1.000
<b>Score anatomia</b> (referência 6 ou mais)			
0-5	1.14	0.36-2.61	0.824
<b>Score anatomia</b>	1.01	0.88-1.16	0.882
<b>Diagnostico receptor PAF</b>	0.38	0.08-1.74	0.214
<b>Número de reinternamentos</b>	1.12	0.84-1.49	0.446
<b>Reinternamento</b> (referência<2)			
≥2	3.17	1.01-10.00	0.049

Legenda da Tabela 12 – HR (Hazard Ratio); IC (Intervalo de confiança); UCI (Unidade de Cuidados Intensivos); MELD (Model for End Stage Liver Disease); Bar (Balance of Risk); \*valor p resultante do modelo de regressão de Cox.

**Tabela 13.** Análise univariável das variáveis histológicas, em cada momento, em relação ao tempo até à morte ou rejeição crónica do enxerto

Histologia	HR	IC 95%	Valor p*
<b>Esteatose</b>			
T0	0.29	0.08-1.04	0.056
T1	0.24	0.05-1.10	0.066
T2	0.13	0.02-1.00	0.050
<b>Neutrófilos</b>			
T0	1.78	0.56-5.64	0.325
T1	1.30	0.40-4.29	0.662
T2	0.85	0.18-4.12	0.842
<b>Congestão sinusoidal</b>			
T0	1.22	0.39-3.85	0.735
T1	0.46	0.14-1.52	0.202
T2	0.62	0.15-2.50	0.503
<b>Balonização</b>			
T0	0.50	0.06-3.88	0.506
T1	0.98	0.21-4.54	0.978
T2	2.38	0.30-19.07	0.414
<b>Necrose</b>			
T0	0.23	0.63-7.01	0.228
T1	1.87	0.54-6.43	0.321
T2	0.94	0.24-3.77	0.932

Legenda da Figura 13 – HR (Hazard Ratio); IC (Intervalo de confiança); \*valor p resultante do modelo de regressão de Cox.

**Tabela 14.** Resultado da análise multivariável para o tempo até à morte ou rejeição crónica do enxerto

Variáveis	OR	IC 95%	Valor p*
<b>Dias internamento</b>	1.04	1.01-1.07	0.004
<b>FASL no T0</b>	1.48	0.96-2.30	0.079
<b>Esteatose no T0</b>	0.08	0.02-0.46	0.004

Legenda da Tabela 14 – OR (Odds Ratio); IC (Intervalo de confiança); min (minutos); \*valor p resultante do modelo de regressão de Cox.

**Tabela 15.** Análise univariável das variáveis histológicas em cada momento segundo a disfunção do enxerto

Característica	O.R.	95% C.I.	Valor de p*
<b>Esteatose</b>			
T0	0.583	0.166 – 2.052	0.401
T1	0.804	0.222 – 2.904	0.739
T2	0.533	0.128 -2.225	0.388
<b>Neutrófilos</b>			
T0	1.556	0.426 – 5.679	0.504
T1	1.417	0.393 – 5.106	0.594
T2	0.427	0.078 – 2.325	0.325
<b>Congestão sinusoidal</b>			
T0	1.147	0.325 – 4.045	0.831
T1	0.686	0.175 – 2.680	0.587
T2	1.174	0.199 – 6.935	0.860
<b>Balonização</b>			
T0	3.500	0.517 – 23.700	0.199
T1	7.500	1.234 – 54.601	0.029
T2	**	**	**
<b>Necrose</b>			
T0	3.250	0.723 – 14.617	0.124
T1	2.357	0.606 – 9.164	0.216
T2	0.632	0.154 – 2.593	0.524

Legenda da Tabela 15 – OR (Odds Ratio); IC (Intervalo de confiança); \*valor p resultante do modelo de regressão logística; \*\*não foi possível calcular devido ao número reduzido de eventos.

**Tabela 16.** Relação dos resultados de expressão genética (Mann - Whitney) com a disfunção do enxerto (“outcome”)

Característica	Disfunção	Med (P25 – P75)	Valor de p
iNOS em T0	Não	0.14 (0.03 – 0.30)	0.381
	Sim	0.21 (0.03 – 0.68)	
iNOS em T1	Não	0.10 (0.03 – 0.19)	0.512
	Sim	0.06 (0.01 – 0.57)	
iNOS em T2	Não	0.06 (0.04 – 0.10)	0.779
	Sim	0.05 (0.03 – 0.38)	
SELE em T0	Não	0.84 (0.44 – 2.98)	<b>0.013</b>
	Sim	2.69 (1.35 – 4.18)	
SELE em T1	Não	1.45 (0.54 – 5.10)	0.310
	Sim	2.05 (0.99 – 6.02)	
SELE em T2	Não	2.34 (1.57 – 4.69)	0.724
	Sim	2.35 (1.20 – 4.25)	
FASL em T0	Não	0.97 (0.72 – 1.86)	0.745
	Sim	1.00 (0.70 – 2.81)	
FASL em T1	Não	0.70 (0.43 – 1.68)	0.209
	Sim	0.45 (0.27 – 1.33)	
FASL em T2	Não	0.22 (0.10 – 0.47)	0.573
	Sim	0.29 (0.13 – 0.64)	
GRZB em T0	Não	1.42 (0.86 – 2.70)	0.566
	Sim	2,96 (0.58 – 4.91)	
GRZB em T1	Não	1.36 (0.65 – 3.78)	0.900
	Sim	0.53 (0.44 – 9.76)	
GRZB em T2	Não	1.68 (0.96 – 4.41)	0.742
	Sim	2.65 (0.78 – 5.33)	
HO-1 em T0	Não	266.29 (146.74 – 385.47)	0.323
	Sim	289.80 (179.39 – 652.55)	
HO-1 em T1	Não	193.79 (147.75 – 275.31)	0.798
	Sim	202.33 (135.82 – 460.55)	
HO-1 em T2	Não	164.32 (125.05 – 353.36)	0.742
	Sim	160.16 (99.72 – 270.90)	
IL-6 em T0	Não	0.37 (0.10 – 2.50)	0.354
	Sim	0.60 (0.20 – 3.54)	
IL-6 em T1	Não	2.26 (0.74 – 4.85)	0.423
	Sim	1.62 (0.23 – 4.97)	
IL-6 em T2	Não	6.40 (2.38 – 14.36)	0.634
	Sim	7.82 (3.31 – 12.10)	
IL-1 Beta em T0	Não	9.84 (2.54 – 19.39)	<b>0.028</b>
	Sim	19.53 (12.10 – 40.88)	
IL-1 Beta em T1	Não	22.67 (8.47 – 46.82)	0.682
	Sim	25.39 (7.87 – 217.55)	
IL-1 Beta em T2	Não	36.35 (17.96 – 89.83)	0.171
	Sim	61.38 (53.19 – 86.65)	

Legenda da Tabela 16 – \*valor p resultante da comparação dos genes entre os grupos de doentes com e sem disfunção do enxerto.



**Tabela 17.** Resultado da análise multivariável para a variável resposta disfunção do enxerto

Variáveis	OR	IC 95%	Valor p*
<b>Género Masculino</b>	0.13	0.01-0.25	0.077
<b>Isquémia fria (min)</b>	1.74	0.95-3.18	0.074
<b>Isquémia quente (min)</b>	1.64	0.91-2.94	0.099
<b>SELE no T0</b>	1.93	1.06-3.50	0.030

Legenda da Figura 17 – OR (Odds Ratio); IC (Intervalo de confiança); min (minutos); \*valor p resultante do modelo de regressão logística

**Tabela 18.** Análise univariável da expressão de genes em todos os momentos para a complicação Dindo-Calvien

Gene	Todos doentes (54)	Doentes sem complicação Dindo-Calvien	Doentes com complicação Dindo-Calvien	Valor p*
<b>FASL mediana (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>				
T0	0.98 (0.72-2.16)	0.87 (0.58-2.31)	0.98 (0.73-2.25)	0.626
T1	0.68 (0.34-1.50)	0.69 (0.34-1.21)	0.61 (0.35-2.34)	0.484
T2	0.25 (0.11-0.52)	0.19 (0.10-0.46)	0.25 (0.12-0.53)	0.605
<b>GRB mediana (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>				
T0	1.51 (0.61-3.70)	1.47 (1.08-3.65)	1.64 (0.60-3.85)	0.050
T1	1.33 (0.47-5.72)	1.59 (0.46-4.31)	1.06 (0.46-38.02)	0.304
T2	2.08 (0.94-4.52)	2.62 (1.05-4.05)	1.76 (0.91-5.64)	0.354
<b>HO1 mediana (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>				
T0	276.60(153.41-419.45)	276.60 (145.41-403.03)	278.04 (159.82-443.12)	0.414
T1	198.06(139.91-291.16)	173.70 (134.60-259.98)	208.01 (143.56-331.04)	0.464
T2	162.24(120.97-315.76)	175.25 (103.48-349.21)	159.89 (124.77-297.93)	0.315
<b>IL-6 mediana (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>				
T0	0.48 (0.15-2.64)	0.36 (0.10-2.15)	0.49 (0.19-2.78)	0.520
T1	1.62 (0.50-4.77)	1.21 (0.70-8.95)	2.73 (0.36-4.51)	0.441
T2	7.19 (2.76-13.42)	7.59 (2.94-11.55)	6.79 (2.54-13.77)	0.727
<b>IL-1b mediana (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>				
T0	12.17 (2.83-24.01)	12.11 (2.58-22.40)	12.22 (3.23-29.82)	0.513
T1	22.67 (8.31-49.51)	20.44 (11.32-51.71)	24.78 (7.34-50.85)	0.390
T2	49.91 (22.40-85.84)	51.39 (28.09-94.50)	43.20 (17.61-80.81)	0.723
<b>iNOS2A mediana (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>				
T0	0.15 (0.03-0.32)	0.14 (0.03-0.29)	0.19 (0.03-0.37)	0.596
T1	0.09 (0.02-0.19)	0.08 (0.02-0.23)	0.11 (0.03-0.20)	0.790
T2	0.06 (0.03-0.13)	0.05 (0.03-0.14)	0.06 (0.03-0.12)	0.638
<b>SEAL mediana (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>				
T0	1.17 (0.49-3.26)	0.91 (0.44-2.51)	1.86 (0.68-3.63)	0.213
T1	1.53 (0.61-5.45)	1.60 (0.54-5.21)	1.53 (0.67-6.57)	0.565
T2	2.30 (1.40-4.56)	2.88 (1.57-5.73)	2.10 (1.28-3.91)	0.503

Legenda da Tabela 18 – \*valor p resultante da comparação dos genes entre os grupos de doentes com e sem complicação Dindo-Calvien através do modelo de regressão logística.

**Tabela 19.** Análise univariável das variáveis histológicas em cada momento para a complicação Dindo-Calvien

Histologia	OR	IC 95%	Valor p*
<b>Esteatose</b>			
T0	0.64	0.19-2.13	0.466
T1	0.44	0.13-1.52	0.194
T2	0.45	0.13-1.62	0.221
<b>Neutrófilos</b>			
T0	0.66	0.19-2.33	0.520
T1	0.37	0.11-1.31	0.122
T2	0.48	0.08-2.84	0.418
<b>Congestão sinusoidal</b>			
T0	1.70	0.51-5.70	0.390
T1	0.94	0.25-3.56	0.925
T2	1.46	0.31-6.92	0.632
<b>Balonização</b>			
T0	1.00	0.15-6.67	1.000
T1	1.79	0.31-10.47	0.521
T2	0.73	0.04-12.52	0.826
<b>Necrose</b>			
T0	1.43	0.31-6.64	0.646
T1	1.07	0.28-4.05	0.925
T2	1.31	0.36-4.78	0.680

Legenda da Tabela 19 – OR (Odds Ratio); IC (Intervalo de confiança); \*valor p resultante do modelo de regressão logística

**Tabela 20.** Análise univariável da expressão de genes em todos os momentos para 2 ou mais reinternamentos

Gene	Doentes com menos de 2 reinternamentos	Doentes com 2 ou mais reinternamentos	Valor p*
<b>FASL median (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>			
T0	1.00 (0.77-2.55)	0.89 (0.63-1.28)	0.258
T1	0.71 (0.43-1.49)	0.52 (0.28-2.06)	0.768
T2	0.32 (0.17-0.57)	0.12 (0.08-0.37)	0.344
<b>GRB median (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>			
T0	1.77 (1.06-5.29)	0.87 (0.45-1.71)	0.050
T1	1.68 (0.58-6.68)	0.62 (0.40-2.58)	0.627
T2	2.74 (1.30-4.65)	1.02 (0.81-9.94)	0.181
<b>HO1 median (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>			
T0	289.29 (156.38-436.07)	257.62 (140.58-419.97)	0.356
T1	204.56 (137.35-311.26)	191.43 (146.91-277.68)	0.641
T2	181.08 (125.55-335.29)	141.78 (105.99-833.19)	0.086
<b>IL-6 median (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>			
T0	0.76 (0.19-3.20)	0.20 (0.11-0.63)	0.100
T1	1.86 (0.49-5.65)	1.62 (0.45-4.28)	0.524
T2	6.79 (2.85-13.77)	8.40 (2.10-13.10)	0.405
<b>IL-1b median (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>			

T0	14.20 (4.77-29.95)	9.70 (2.67-19.06)	0.416
T1	22.67 (8.14-45.89)	19.40 (7.91-85.58)	0.986
T2	51.39 (19.21-89.83)	37.74 (23.68-125.22)	0.252
<b>iNOS2A median(P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>			
T0	0.15 (0.03-0.36)	0.13 (0.02-0.32)	0.465
T1	0.11 (0.03-0.25)	0.07 (0.01-0.11)	0.342
T2	0.07 (0.03-0.14)	0.04 (0.03-0.08)	0.980
<b>SEAL median (P<sub>25</sub>-P<sub>75</sub>)</b>			
T0	1.34 (0.49-3.09)	1.09 (0.51-3.43)	0.612
T1	1.70 (0.64-5.57)	1.16 (0.55-4.79)	0.635
T2	2.13 (1.45-4.43)	2.62 (1.20-5.52)	0.855

Legenda da Tabela 20 – \*valor p resultante da comparação dos genes entre os grupos de doentes com menos de 2 reinternamentos e com 2 ou mais reinternamentos através do modelo de regressão logística.

**Tabela 21.** Análise univariável das variáveis histológicas em cada momento para 2 ou mais reinternamentos

Histologia	OR	IC 95%	Valor p*
<b>Esteatose</b>			
T0	0.29	0.07-1.13	0.074
T1	0.33	0.08-1.28	0.108
T2	0.36	0.09-1.44	0.148
<b>Neutrófilos</b>			
T0	0.73	0.18-2.87	0.649
T1	1.42	0.39-5.11	0.594
T2	0.58	0.11-3.08	0.522
<b>Congestão sinusoidal</b>			
T0	0.96	0.27-3.45	0.954
T1	1.13	0.28-4.57	0.869
T2	0.76	0.15-3.81	0.736
<b>Balonização</b>			
T0	0.52	0.05-5.12	0.575
T1	0.80	0.14-4.75	0.806
T2	**	**	**
<b>Necrose</b>			
T0	1.14	0.24-5.39	0.872
T1	1.46	0.37-5.70	0.587
T2	0.94	0.24-3.68	0.931

Legenda da Tabela 21 – OR (Odds Ratio); IC (Intervalo de confiança); \*valor p resultante do modelo de regressão logística;

**Tabela 22.** Análise univariável da expressão de genes, em todos os momentos, em relação ao tempo até à morte ou rejeição crónica do enxerto

Gene	HR	IC 95%	Valor p*
<b>FASL</b>			
T0	1.24	0.90-1.72	0.194
T1	1.00	1.00-1.01	0.138
T2	1.12	0.98-1.29	0.107
<b>GRB</b>			
T0	0.95	0.73-1.23	0.670
T1	1.01	1.00-1.01	0.171
T2	1.03	1.01-1.06	0.016
<b>HO1</b>			
T0	1.00	1.00-1.00	0.596
T1	1.00	1.00-1.00	0.175
T2	1.00	1.00-1.00	0.002
<b>IL-6</b>			
T0	0.97	0.76-1.23	0.795
T1	1.00	1.00-1.01	0.233
T2	1.01	1.00-1.01	0.192
<b>IL-1b</b>			
T0	1.00	0.96-1.03	0.897
T1	1.00	1.00-1.00	0.083
T2	1.00	1.00-1.00	0.114
<b>iNOS2A</b>			
T0	0.48	0.03-7.15	0.597
T1	0.58	0.02-17.39	0.752
T2	0.99	0.88-1.12	0.869
<b>SEAL</b>			
T0	1.04	0.95-1.14	0.372
T1	1.01	0.98-1.03	0.651
T2	1.01	0.98-1.03	0.604

Legenda da Tabela 22 – HR (Hazard Ratio); IC (Intervalo de confiança); \* valor p resultante do modelo de regressão. \*\*não foi possível calcular devido ao número reduzido de eventos.

**Tabela 23.** Análise univariável das variáveis histológicas, em cada momento, em relação ao tempo até à morte ou rejeição crónica do enxerto

Histologia	HR	IC 95%	Valor p*
<b>Esteatose</b>			
T0	0.29	0.08-1.04	0.056
T1	0.24	0.05-1.10	0.066
T2	0.13	0.02-1.00	0.050
<b>Neutrófilos</b>			
T0	1.78	0.56-5.64	0.325
T1	1.30	0.40-4.29	0.662
T2	0.85	0.18-4.12	0.842
<b>Congestão sinusoidal</b>			
T0	1.22	0.39-3.85	0.735
T1	0.46	0.14-1.52	0.202
T2	0.62	0.15-2.50	0.503
<b>Balonização</b>			
T0	0.50	0.06-3.88	0.506
T1	0.98	0.21-4.54	0.978
T2	2.38	0.30-19.07	0.414
<b>Necrose</b>			
T0	0.23	0.63-7.01	0.228
T1	1.87	0.54-6.43	0.321
T2	0.94	0.24-3.77	0.932

Legenda da Tabela 23 – HR (Hazard Ratio); IC (Intervalo de confiança); \*valor p resultante do modelo de regressão de Cox.



## CLINICAL OUTCOMES AND GENETIC EXPRESSION PROFILE IN HUMAN LIVER GRAFT DYSFUNCTION DURING ISCHEMIA REPERFUSION INJURY

Jorge Paulino<sup>1\*</sup>, Emanuel Vigia<sup>1</sup>, Paulo Marcelino<sup>2</sup>, Olga Abade<sup>3</sup>, João Sobral<sup>4</sup>,  
Dário Ligeiro<sup>3</sup>, Ana Carvalho<sup>5</sup>, Marta Alves<sup>6</sup>, Ana Luísa Papoila<sup>6</sup>, Hélder  
Trindade<sup>3</sup>, Eduardo Barroso<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Hepatobiliopancreático e de Transplantação, Hosp. Curry Cabral, Universidade Nova de Lisboa

<sup>2</sup>CEDOC, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Nova de Lisboa

<sup>3</sup>Centro de Histocompatibilidade do Sul, Universidade Nova de Lisboa

<sup>4</sup>Instituto Gulbenkian de Ciência, Oeiras

<sup>5</sup>Serviço de Anatomia Patológica, Hospital Curry Cabral, Universidade Nova de Lisboa

<sup>6</sup>Departamento de Bioestatística, Universidade Nova de Lisboa

\*Corresponding Author:

Jorge Paulino, Centro Hepatobiliopancreático e de Transplantação, Hosp. Curry Cabral, Universidade Nova de Lisboa. Hospital Curry Cabral – Rua da Beneficência, 8 – 1069-166 Lisboa, Portugal. Tel. - + 351 7924200 , Fax - +351 217924315. Email: fusilis@gmail.com

### Abstract

This study aims at comparing the molecular gene expression during ischemia reperfusion injury (IRI). Several surgical times were considered: in the beginning of the harvesting, T0; at the end of the cold ischemia period, T1; and post reperfusion, T2, and compared with graft dysfunction after liver transplant (LT).

For this purpose 54 patients undergoing LT were studied. Several clinical and laboratory data, histological data (Suzuki classification) as well as the SOFT-score (Survival Outcomes Following Liver Transplantation) were used and compared with the molecular gene expression of the following genes: IL-1b, IL-6, TNF  $\alpha$ , perforin, E-selectin (SELE), Fas-ligand, Granzyme B, Heme oxygenase-1 (HO1) and nitric oxide sintetase (iNOS2A).

It was observed that 15 patients presented graft dysfunction according to SOFT criteria. No relevant data was obtained by comparing the variables graft

dysfunction and hystological variables. We observed a statistically significant relation between SELE in T0 ( $p=0.013$ ) and IL 1 $\beta$  in T0 ( $p=0.028$ ) and early graft dysfunction.

We conclude that several genetically determined pro-inflammatory expression may play a critical role in the development of graft dysfunction after LT.

**Key-words:** liver transplant; ischemia reperfusion syndrome; inflammation;



## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Doentes

Este grupo de 54 doentes foi obtido sem uma metodologia específica, traduzindo, como já foi referido, a disponibilidade das várias equipas envolvidas no processamento do material obtido pelas biopsias. Constituiu-se assim, um grupo relativamente homogéneo e com casos de evolução favorável, na grande maioria.

**Idade e género do receptor** - A idade mediana baixa (54 anos) também contribuiu para um bom prognóstico, sendo o sexo masculino fortuitamente o mais frequente, em mais de 70% dos casos (42 receptores do género masculino e 12 do sexo feminino).

**Grupos sanguíneos** - A distribuição por grupos sanguíneos acompanha a distribuição na população em geral, sendo, portanto, os grupos mais frequentes o A e o O.

**Risco cirúrgico** - Considerando o subgrupo de doentes com doença hepática crónica (36 doentes), as classificações utilizadas na definição pré-operatória de risco (MELD e Child – Turcotte - Pugh) definiram também pontuações relativamente baixas, com mediana de 16 e mais de 50% de grupo A, respectivamente.

Também os casos que foram pontuados como Baixo Risco, segundo a classificação de SOFT, constituíram a grande maioria (mais de 70%), reflectindo a inclusão dum considerável número de casos de doentes com PAF.

**Patologias dos receptores** - Considerando as patologias dos receptores, o número relativo de doentes por patologia define bem a frequência de cada uma, num programa como o nosso, na época em que decorreu este estudo, com a PAF, a doença a vírus C e a doença alcoólica como principais indicações.

**Alocações** - Não tendo havido uma inclusão aleatória dos doentes estudados, houve, sim, a preocupação de incluir na amostra, casos dos três tipos de alocação possível,

em curso na nossa unidade, em quantidades suficientes que permitissem retirar conclusões referidas nos objectivos.

A metodologia utilizada neste grupo de 54 doentes, relativamente ao escalonamento por tipos de alocação, permitiu obter três grupos (1 com n=27, 2 com n=15 e 3 com n=12) relativamente homogéneos para processamento estatístico.

Estando já demonstrada a qualidade do enxerto proveniente de dador vivo com PAF (1), houve possibilidade de reunir um número relevante de situações destas, dado o número de receptores em lista de espera para transplante hepático com esta patologia, considerando o período temporal em que decorreu o estudo.

A composição da lista de espera por patologias no Centro do Hospital Curry Cabral, viria a alterar-se profundamente nos anos subsequentes, diminuindo o número de doentes com PAF e aumentando o número de casos de doença hepática crónica com classificações de risco operatório mais elevadas. A diminuição de doentes em lista de espera com o diagnóstico de PAF, deveu-se ao início da terapêutica médica com Tafamidis (2).

No presente estudo, as amostras de alguns dos doentes PAF (simultaneamente receptores e dadores) previamente incluídos, não foram apropriadamente recolhidas e, conseqüentemente, foram excluídas da amostragem inicialmente seleccionada. Por este motivo, o número de amostras analisadas (54) foi menor que o inicialmente previsto.

**Idade dos dadores** - A idade dos dadores foi mais alta no grupo 2, sem diferença significativa entre os 3 grupos. Sendo um dos parâmetros considerado como dos mais relevantes em termos clínicos, é sempre uma prioridade no que respeita a alocação de órgãos.

Habitualmente, os receptores com PAF têm idade entre os 21 e os 73 anos (média 41,2 ± 11,1 anos, mediana 38,1 anos: FAPWTR – Familial Amyloidotic Polyneuropathy World Transplant Registry - [www.fapwtr.org](http://www.fapwtr.org)) inferior aos restantes receptores adultos, sendo uma indicação para transplante hepático mais precoce

relativamente aos receptores com doença hepática crónica, sendo transplantados com enxertos mais jovens. O típico receptor dos grupos 2 e 3 recebe habitualmente um enxerto com menor idade que o típico receptor do grupo 1 (enxerto cadavérico para receptor cirrótico).

Nesta amostra, porém, este parâmetro não teve grandes oscilações, sendo por isso irrelevante em termos de conclusões ( $p=0.655$ ).

**Causa de morte dos dadores** – Como a amostra foi escassa, neste parâmetro não houve tratamento estatístico.

Apesar de não ser uma amostra aleatória, as percentagens relativas das causas de morte ilustram o padrão de todo o mundo ocidental, onde os dadores em morte cerebral são, nitidamente, os maiores fornecedores de aloenxertos.

A doença cerebrovascular como causa de morte é considerada um factor de risco no transplante, integrando a pontuação desfavorável de algumas classificação de risco de transplante hepático, como o S.O.F.T. (3).

A decisão quanto à alocação dos enxertos não incluiu, em nenhum caso, a causa de morte do dador.

**Tempo de isquémia fria** - Também o tempo de isquémia fria não revelou alterações significativas entre os três grupos ( $p=0.715$ ), sendo maior no grupo 2.

Está bem documentado na literatura o efeito deletério do prolongamento da isquémia fria hepática para além das 12 horas (4), noutros casos para além das 11 horas, relatando mesmo, alguns estudos, o benefício do encurtamento deste tempo para intervalos mais reduzidos: esse ideal está descrito na literatura como inferior a 5 horas (5).

Muitos factores interferem com este parâmetro e é importante referir a localização do hospital dador, a logística na gestão das equipas cirúrgicas e bloco operatório, a proveniência e a preparação pré operatória do receptor e a duração e complexidade do trabalho de banca (“back table”).

Apesar do encurtamento da isquemia fria ser sempre um factor importante, ele torna-se ainda mais prioritário em situações clínicas com pontuações pré-operatórias de risco mais elevadas (MELD , Child – Turcotte – Pugh e SOFT). Seria expectável uma preocupação com o encurtamento da isquémia fria mais marcada nos doentes tendencialmente mais graves e mais idosos (grupos 1 e 3), não demonstrada face ao número reduzido da amostra e à relativa homogeneidade da mesma.

Refira-se que uma das vantagens atribuídas à doação em vivo (grupo 3) é precisamente um encurtamento da isquémia fria: a programação em paralelo da operação do dador e do receptor permite otimizar todo o procedimento.

Mesmo a necessidade dum trabalho de banca com várias reconstruções vasculares não aumentou aquele parâmetro.

Em raros casos da nossa casuística global, o potencial enxerto PAF foi recusado por ter uma vascularização arterial incompatível com uma reconstrução segura.

**Tempo de isquémia quente** – Sendo um parâmetro importante, só se salienta nos casos de variações extremas, não existente na amostra estudada. Considerou-se como o intervalo de tempo entre a retirada do enxerto do gelo (final do trabalho de banca ou “back table”) e a reperfusão, também denominada na literatura como segunda isquémia quente. De todos os casos registados, os tempos variaram entre 40 e 98 minutos, com 17 casos com menos de 60 minutos, 13 casos entre os 60 e os 90 minutos e 4 casos com mais de 90 minutos.

A variação da isquémia quente depende da execução das anastomoses das veias supra hepáticas e da veia porta, e traduz os factores anatómicos do receptor e do enxerto e respectivos pedículos.

Outras variações no conceito de isquémia quente, referidas na literatura, incluem factores decorridos na operação de colheita multiorgânica (intervalo de tempo entre a clampagem aórtica e o início da perfusão de soluto de preservação e o

arrefecimento peritoneal com gelo), e no tempo decorrido até à finalização da arterialização do enxerto: todos esses factores, apesar de poderem contribuir para a lesão de I/R, não foram registados no presente estudo.

Apenas se contabilizou o tempo operatório total em 37 dos 54 casos estudados, o que não permitiu conclusões estatísticas, dada a escassez da amostra. Contabilizado em minutos, variou de 240 a 400 minutos, sendo os 37 doentes contabilizados divididos por três grupos: até 250 minutos (5 casos, 4 doentes com PAF), 251 a 350 minutos (20 casos, 4 doentes com PAF) e mais de 350 minutos (12 casos, 2 doentes com PAF).

O tempo total da intervenção traduz múltiplas variáveis, nomeadamente o tipo de patologia, o peso e a anatomia do receptor, o volume do fígado a explantar e do enxerto, as características dos pedículos vasculares e da via biliar do receptor e enxerto, a equipa cirúrgica, o tempo de hemóstase, entre muitas outras.

A variável mais evidente é o tipo de patologia do receptor (PAF ou não PAF), dadas as características anatómicas e a ausência de hipertensão portal, tornando, em média, a fase de hepatectomia mais rápida: no entanto, estas vantagens podem não se evidenciar tanto, pela necessidade de respeitar a integridade dos pedículos do fígado explantado, incluindo as eventuais variações anatómicas, no caso de transplante sequencial, sem prejudicar os pedículos do doente PAF dador. Há também que ter em conta a tendência para uma maior taxa de trombose arterial neste tipo de doentes, descrita na literatura.

**Consumo de sangue e hemoderivados intraoperatório** – Considerando os 3 grupos referidos de doentes por alocação do enxerto, não se registaram diferenças significativas no consumo intraoperatório de unidades de concentrado eritrocitário, apesar dum maior consumo nos doentes do grupo 1 ( $p=0.087$ ), variando de 3 a 13 na totalidade.

No grupo de 54 doentes estudados, seria de prever um maior consumo de unidades de CE nos receptores não PAF, pela presença de hepatopatia aguda ou crónica, a maioria das vezes complicada com hipertensão portal.

O conhecimento contemporâneo mais aprofundado dos mecanismos de hemóstase durante o transplante hepático e, em particular, na doença hepática crónica, conduziu a uma visão alternativa denominada na literatura como conceito de hemóstase rebalanceada (6). Este conceito recente define uma alteração nas vias pro e anticoagulantes com vista a um equilíbrio hemostático, mesmo em doentes com anomalias graves nos testes clássicos (INR, APTT e plaquetas), indicando que estes testes são insuficientes para traduzir o actual estado da coagulação. Mesmo levando em consideração as grandes alterações destes equilíbrios decorrentes da fase anhepática e da reperfusão, é possível manter esse balanço hemostático em muitos doentes, durante todo o acto operatório, com o recurso a escassas ou nenhuma unidades de CE.

Apreciando as diferentes necessidades de transfusões intraoperatórias consoante a patologia do receptor (PAF versus não PAF), há que considerar outros factores como a presença de nódulo(s) de carcinoma hepatocelular (CHC) e o volume de sangue processado e reinfundido pelo sistema de autotransfusão (Cell Saver, Haemonetics Corporation, MA, E.U.A.). Por protocolo, este sistema não é utilizado, por razões oncológicas, até ao final da hepatectomia em doentes com nódulo(s) de CHC. O referido sistema também não é utilizado nos doentes sem hipertensão portal ou em situações em que se antecipem perdas hemáticas inferiores a 1000 cc ou menos de 20% da volémia. Ao reduzir significativamente as necessidades de transfusões alogénicas, o seu uso equilibra os consumos de unidades de CE nos dois grupos de receptores considerados.

No grupo de 54 doentes estudados, os volumes de sangue processados e reinfundidos pelo sistema de autotransfusão não foram registados em todos os casos em que se utilizou.

Já no consumo de unidades de plasma fresco congelado, registou-se uma diferença com significado estatístico entre os grupos 1 e 3, com maiores consumos no primeiro grupo ( $p=0.013$ ). Esta diferença pode ser explicada pelo desempenho diferente do enxerto PAF relativamente ao enxerto cadavérico, uma vez que a função da coagulação não difere segundo os respectivos receptores.

O plasma fresco congelado é um produto muito usado durante o acto operatório para evitar ou controlar a hemorragia, contendo factores agonistas e antagonistas da cascata da coagulação, albumina, imunoglobulinas e proteínas de fase aguda. A sua eficácia varia consoante a labilidade dos factores de coagulação existentes na sua composição, sendo bem estabelecida a baixa progressiva dos factores V e VIII com o decorrer do tempo. Assim, a diferente resposta ao uso do PFC, bem como as diferentes necessidades no seu consumo intraoperatório, também podem ser devidas a diferenças genéticas dos dadores de sangue (7).

**Valor máximo das aminotransferases** – A elevação dos valores séricos das aminotransferases (AST e ALT) no sangue periférico dos doentes transplantados hepáticos, é considerada como um marcador usual de lesão do enxerto. Está na base de um dos critérios utilizados na prática clínica (critério de Howard, (8)).

A lesão de preservação pode envolver os hepatocitos, as células de Kupffer, as células do epitélio biliar e as células endoteliais, mas a magnitude da elevação das aminotransferases reflecte a extensão da lesão hepatocelular. No entanto, outros parâmetros são indispensáveis para indicar a capacidade do enxerto, como a produção biliar qualitativa e quantitativa, o estado da coagulação, o nível de consciência e a condição hemodinâmica do doente.

A elevação máxima do nível sérico da aspartato aminotransferase nas primeiras 72 horas (ASTmax) é considerada por alguns autores um parâmetro indicador de lesão de isquemia reperfusão e de preservação que pode ser estratificada consoante o seu valor como: <600 – ligeira, 600-2000 – moderada, >2000-5000 – severa e >5000 – extrema (9). O nível de ASTmax a partir do qual se reflecte a inviabilidade do enxerto a longo prazo e um aumento na mortalidade não está, no entanto, definido, variando na literatura entre 2000 e 5000 (10).

Talvez por esta razão, no presente estudo não verificamos quaisquer alterações estatisticamente significativas entre os 3 grupos de doentes por alocação, uma vez que, em todos os doentes, tanto o valor de ALTmax como o de ASTmax foi inferior a 2000 ( $p=0.067$  e  $p=0.087$  respectivamente).

## 6.2. Histologia

As diferenças histológicas evidenciadas no grupo de 54 enxertos hepáticos, são na generalidade pouco marcadas, no que respeita às consequências microscopicamente mensuráveis da lesão de isquémia/reperfusão, quando se comparam os três grupos de doentes.

Mesmo assim, as diferenças histológicas entre os grupos foram suficientes para alcançar significado estatístico, ilustrado anteriormente na Figura 1 (entre os grupos 1 e 2, este com pontuação menor:  $p=0.023$ ). Os receptores com doença PAF (grupo 2) têm uma média de idade geralmente mais baixa, sendo transplantados com enxertos que, por serem mais jovens, resistem melhor às sucessivas agressões do procedimento de colheita e transplante, variações térmicas e sucessivos tempos de isquémia, culminando na reperfusão.

Esta previsão não se concretizou no grupo 2, em que, como já referido, a idade média dos dadores foi ligeiramente superior aos dois outros grupos. Por isso, a explicação mais provável para esta diferença histológica está na maneira como a patologia do receptor, por não deteriorar a função hepática, influencia o desempenho do enxerto.

Pela análise temporal da evolução das características histológicas, evidencia-se uma tendência para a estabilidade das lesões observadas na microscopia clássica, que, ao demonstrar resistência às agressões sucessivas, pode traduzir uma eficácia das técnicas de preservação.

Contrariando esta disposição, evidencia-se o aumento de enxertos do grupo 3 com lesões histológicas nas biopsias, traduzindo porventura o efeito da patologia do receptor, ilustrando o comentário feito acima, mas no sentido inverso.

Numa análise global, os resultados histológicos sucessivos não foram suficientemente expressivos para diferenciarem os tipos diferentes de enxerto numa perspectiva clínica. Existe apenas uma ligeira evidência de correlação entre o grupo



de doentes, por alocação, e a pontuação anatomopatológica (alta ou baixa). No entanto, é importante considerar que, dada a escassez da amostra grupo a grupo, o presente trabalho é um estudo exploratório e não um ensaio clínico, pelo que, mesmo abaixo do limiar estatístico, as conclusões devem contemplar algumas evidências.

**Infiltração neutrofílica** - é importante referir que de todos os parâmetros histológicos contabilizados, apenas este se revelou com uma diferença evidente, se bem que sem significado estatístico, entre os grupos por alocação: na biopsia inicial (T0) é menor nos enxertos provenientes de dador vivo com PAF ( $p=0.082$ ).

Este facto é suficientemente relevante para poder diferenciar este tipo de enxerto, também do ponto de vista histológico, dos enxertos cadavéricos. O seu desempenho clínico mais favorável já foi demonstrado na literatura, pelo nosso grupo, e a relativa superioridade dos resultados de enxertos provenientes de dador vivo está amplamente demonstrada.

A presença de neutrófilos na microcirculação hepática é um fenómeno reconhecido, mesmo em condições fisiológicas, tendo-se demonstrado que a vida média deste tipo celular em humanos poderá ser 5,4 dias.

A maior infiltração por neutrófilos na biopsia T0 (início da operação de colheita multiorgânica) nos enxertos cadavéricos pode traduz os efeitos da morte cerebral, com as suas consequências sistémicas descritas na literatura, ausentes nos enxertos provenientes de doentes com PAF.

Aquela característica histológica revela a precocidade do efeito sistémico da morte cerebral, aliada ao efeito da agressão cirúrgica: os neutrófilos são mediadores celulares importantes da lesão de I/R após 6 horas de reperfusão, demonstrado em estudos com modelo animal de isquemia hepática parcial.

A totalidade dos enxertos cadavéricos no presente estudo foi proveniente de dadores cuja causa de morte foi traumatismo cranioencefálico, doença cerebrovascular ou encefalopatia anóxica. Esta lesão irreversível do sistema nervoso central (SNC) associa-se sempre ao síndrome sistémico de resposta inflamatória

(S.I.R.S.), que pode ocorrer mesmo com a barreira hematoencefálica intacta, implicando uma etiologia distinta para além da libertação de citocinas pelo SNC.

O SIRS associa-se à mobilização e recrutamento de leucócitos para os órgãos periféricos, incluindo o fígado, activando e libertando mediadores inflamatórios, gerando radicais livres de oxigénio e aumentando a permeabilidade vascular, conduzindo à disfunção do órgão.

A rotura da barreira hematoencefálica, presente na maioria dos dadores em morte cerebral, permite a circulação bidireccional das células inflamatórias e seus mediadores, actuando como uma preparação dos órgãos periféricos para agressões acrescidas, bem demonstrada no coração, pulmão e rim (11).

As várias etiologias de morte cerebral dos 42 dadores estudados podem condicionar o processo inflamatório no fígado: em modelos animais foi demonstrada uma diminuição da perfusão hepática ao nível da microcirculação sinusoidal com redução do seu diâmetro, através do uso de microscopia intravital.

**Esteatose** – Este parâmetro não revelou diferenças relevantes entre os vários tipos de enxertos, apesar de ser muito frequente (26 em 54 enxertos–19%), em consonância com a prevalência descrita na literatura, entre 13 e 50% (12). Foi registada como ligeira (até 30%) em 21 casos e moderada em 5 (entre 30 e 60%). Em situações electivas, não é habitual, na nossa Unidade de Transplantação, a aceitação de enxertos hepáticos com índices de macroesteatose superiores a 30%: não existindo um limite absoluto protocolizado, a decisão quanto a este parâmetro é tomada caso a caso e em conjunto com o contexto clínico, imagiológico e analítico do dador.

Tal como é prática comum na maioria dos Centros de Transplantação Hepática, o factor prioritário na decisão foi o aspecto macroscópico do fígado, avaliado por uma equipa cirúrgica experiente: assim se explica que na maioria dos casos, não se efectue biopsia no início da colheita. No entanto, em casos de suspeita pré operatória de esteatose considerável, justifica-se a biopsia no sentido de se tentar alargar o número de enxertos transplantáveis, até porque a evidência comprova que

o julgamento clínico macroscópico se torna menos preciso com índices superiores a 35% (Conferência de consenso de Paris – Critérios expandidos da doação (13)).

Efectuou-se biopsia hepática prévia à decisão de colocação do enxerto em situações pontuais:

- Sempre que o aspecto macroscópico sugerisse dúvidas relativamente à sua qualidade, de acordo com a equipa cirúrgica
- Dadores com idade superior a 70 anos colhidos por outras equipas cirúrgicas
- Indicações de marginalidade do dador pela alteração analítica e/ou imagiológica

No caso da reduzida amostra de 5 enxertos transplantados com índices moderados de esteatose (acima de 30%), apenas se registaram disfunções primárias do enxerto em duas situações (uma das quais por retransplante), que também registaram complicações pós operatórias, que serão comentadas no capítulo respectivo. Revendo todo o processo destas cinco situações, não houve nenhum registo de insucesso do transplante, demonstrando uma alocação correcta.

As várias pontuações de risco de transplante usadas presentemente, recorrendo a vários factores tanto do dador como do receptor, excluem o grau de esteatose do enxerto, que é um factor de risco independente de sobrevida pós transplante hepático ortotópico: no entanto foi demonstrado recentemente que o risco é aceitável para graus superiores a 30% desde que conjugado com pontuações de outros factores de risco até um limiar baixo (14).

### **6.3. Microscopia electrónica**

Os aspectos morfológicos ultraestructurais obtidos nas biopsias no final da isquémia fria (T1), não apresentaram diferenças relativamente ao aspecto habitual, no que respeita aos hepatocitos. A ausência de alterações das células parenquimatosas hepáticas justifica-se pela relativa resistência dos hepatocitos à isquémia fria (15).

Por esta metodologia, evidenciaram-se aspectos que com essa definição se podem apreciar melhor, como grânulos de lipofuscina no citoplasma. Caracteristicamente, este pigmento localiza-se preferencialmente em grânulos citoplasmáticos dos hepatocitos da zona 3 (centrolobular) (16).

A lipofuscina (traduzindo “gordura escura”, do Grego e do Latim) é habitualmente designada como um pigmento de envelhecimento e degradação celular, aumentando com a idade. É resultante da oxidação de resíduos lipídicos e proteicos, contendo também glúcidos e metais, em menor quantidade, podendo associar-se ao consumo de álcool, ilustrando antecedentes do dador (17).

Na pós reperfusão (T2), os aspectos mais relevantes nos hepatocitos foram o aumento de volume e a alteração do contorno das mitocôndrias, e as alterações da cromatina.

As alterações morfológicas na ultraestrutura das mitocôndrias, com aumento de volume e perda das cristas por edema, são devidas a alterações do equilíbrio osmótico, traduzindo disfunção da síntese proteica intramitocondrial e da cadeia respiratória (18). No entanto, o seu aumento de volume pode traduzir um processo de adaptação celular ao stress oxidativo (19).

A morfologia da cromatina depende da actividade da RNA polimerase, tendendo a aglutinar-se nas fases em que está inibida (20). Na pós reperfusão as alterações nucleares derivam da anóxia, traduzindo fases iniciais e reversíveis de processos necróticos, com diminuição do pH da matriz . Em processos de agressão celular, como na pós reperfusão, pode traduzir processos de apoptose, constituindo corpos acidófilos ou de Councilman (21).

#### **6.4. Expressão genética**

O grupo de doentes transplantados com enxerto de dador vivo com PAF revelou determinadas características a nível molecular, que, de alguma forma, diferenciam este subtipo de enxerto.

Por outro lado, o grupo de enxertos cadavéricos transplantados em receptor com PAF (grupo 2) revelou um perfil de expressão genética mais favorável em relação ao grupo 1 (enxerto cadavérico em receptor cirrótico), e alguns genes do painel, melhor que o grupo 3 (dador vivo de PAF).

A explicação mais correlacionável com os dados da literatura é a influência, ou não, dos fenómenos de morte cerebral sobre os órgãos periféricos. Mas a interpretação de diferenças genéticas entre os enxertos, apesar de por vezes ser muito subtil, não se esgota neste argumento:

- algumas delas são detectadas logo no momento T0, bem antes da reperfusão
- existe evidência de algumas diferenças se deverem à patologia e ao estado do receptor (sobretudo relativamente aos receptores com PAF)
- registaram-se diferenças importantes, algumas com significado estatístico, comparando enxertos cadavéricos, de acordo com a alocação, mesmo mantendo variáveis que as poderiam justificar (idade, sexo, tempos de isquémia ou circunstâncias cirúrgicas registadas)

Até ao momento, existem muitos estudos publicados, que estudam ao pormenor, as particularidades da expressão genética no contexto de dador vivo, usando como modelo o fígado parcial, direito ou esquerdo, que comporta inevitavelmente, as consequências da agressão cirúrgica da manipulação e da transsecção hepática. Também é conhecido o efeito inflamatório da manipulação hepática durante a transsecção hepática e o transplante, tanto em modelo clínico (22) como em modelo animal (23). No entanto, não estão ainda descritas as características moleculares do enxerto de fígado inteiro em transplante sequencial.

As particularidades deste modelo de dador vivo iniciam-se na expressão genética logo no início da agressão cirúrgica da colheita, ainda com pouca ou quase nenhuma manipulação hepática, com algumas diferenças do grupo 3 em relação aos outros. Mas as interpretações das expressão genética nos outros momentos (T2 e T3) devem considerar o facto das manipulações importantes na cirurgia da colheita, acarretando uma técnica cirúrgica de dissecção extensa e laboriosa de pedículos vasculares até quase ao hilo, e a separação completa do lobo caudado da veia cava.

**Biopsia no início da operação de colheita (T0)** – Nesta biopsia (tempo 0), os registos de expressão genética reflectem apenas as circunstâncias mais precoces das múltiplas agressões sobre o enxerto hepático: morte cerebral e circunstâncias da manutenção do dador (grupos 1 e 2) e os fenómenos sistémicos decorrentes da agressão cirúrgica (comum para todos os grupos). Os resultados são, naturalmente, independentes do receptor, revelando essencialmente as características intrínsecas do enxerto, o que constitui uma oportunidade de avaliação da sua qualidade antes da sua utilização.

Apesar de não integrar as consequências da morte cerebral, o enxerto do grupo 3 (proveniente de dador com PAF) está sujeito a particularidades hemodinâmicas inerentes à própria disautonomia, que se podem manifestar desde o início da indução anestésica, nomeadamente com uma resposta anormal aos fármacos administrados (24). Assim, estas particularidades da doença PAF podem reflectir-se na própria expressão de alguns dos genes estudados.

Apesar de não haver referências conhecidas na literatura, a particularidade das células hepáticas dos doentes portadores de PAF sintetizarem a transtirretina mutada, pode contribuir, eventualmente, para mecanismos moleculares responsáveis por um perfil de expressão genético específico.

A **IL-1 $\beta$  em T0** obteve uma expressão diferente entre os 3 grupos de doentes, mas sem significado estatístico ( $p=0.076$ ). Foi inferior nos enxertos provenientes de doentes com PAF (grupo 3) em relação aos enxertos cadavéricos transplantados em doentes cirróticos. No entanto, a expressão menor foi registada nos doentes do grupo 2 (cadáver para PAF), ao contrário do previsto, uma vez que estes enxertos sofrem a acção deletéria do período de morte cerebral.

A expressão do gene responsável pela síntese desta potente citocina pró inflamatória, produzido pelas células do sistema imunitário inato, pode ser interpretada como uma activação dos macrófagos residentes no fígado, células de

Kupffer (25). Pode relacionar-se com a agressão cirúrgica ou com o processo de morte cerebral.

A IL-1 $\beta$  é uma citocina do tipo 1 que é sintetizada muito precocemente na cascata inflamatória, sendo detectada poucos minutos após a lesão cerebral, e é responsável, tal como a TNF $\alpha$ , pela regulação de múltiplas vias importantes (26).

O estímulo à secreção de IL-1 $\beta$  está amplamente descrito, podendo ser devido a alterações da temperatura e do pH, do balanço redox e da osmolaridade, e a sua transformação em moléculas biologicamente activas pode ser devida à acção de proteases provenientes de microrganismos do sangue portal, como por exemplo a *Candida albicans* ou o *Staphylococcus aureus*, entre outros. Todos esses microrganismos libertam moléculas que no seu conjunto são designadas MAMPs (“Microbe Associated Molecular Pattern”, (27)).

As MAMPs condicionam o sistema imunitário inato do fígado, eventualmente através do controle da população de macrófagos, residentes ou não (27). Activam estas células pelo mecanismo de glicoproteínas transmembranares designadas “Toll Like Receptors”, estimulando a síntese de moléculas pró-inflamatórias, como a IL-1 $\beta$ .

A maior presença de microorganismos provenientes do fluxo portal nos enxertos cadavéricos pode ser consequência da maior permeabilidade do epitélio intestinal, que permite a translocação bacteriana após o processo de morte cerebral, com aumento circulante de lipopolissacáridos (28). Este facto foi considerado como possível agente etiológico na contaminação do soluto de preservação, colhido no final da isquémia fria, pelos mesmos microorganismos que posteriormente se comprovam como agentes causadores de complicações infecciosas nos receptores (dados não publicados, constatados pelo nosso grupo).

Sendo uma molécula muito precoce e muito importante na lesão inflamatória, a IL-1 $\beta$  é tendencialmente menos expressada nos enxertos com menor agressão, o que denota, na presente amostra de 54, um perfil mais favorável no grupo 2. Pode desde logo contribuir para a diferenciação dos enxertos segundo a sua qualidade, mesmo antes da sua utilização e independentemente do grupo por alocação.

A **Granzima B** em T0 obteve uma expressão maior nos enxertos provenientes de doentes com PAF (grupo 3), com significado estatístico relativamente aos outros grupos ( $p=0.013$ ). Esta diferença foi mais notória ( $p=0.011$ ) na relação da expressão entre os grupos 2 (menor) e 3 (maior). Esta diferença tão expressiva, representa uma interferência multifactorial no sistema imunitário adaptativo, para além da morte cerebral.

A acção da Granzima B, em sinergia com a Perforina, constitui a via de eliminação celular por apoptose mais importante, utilizada pelos linfócitos citotóxicos, se bem que a relação entre estas duas proteínas não esteja ainda totalmente compreendida (29).

Os linfócitos e as células NK (Natural Killer Cells), responsáveis pela eliminação de células infectadas por vírus ou alteradas, podem induzir apoptose pelo mecanismo de grânulos citotóxicos contendo Granzima B, que são inoculados na célula alvo através de exocitose. Está descrita uma adaptação das células alvo a este mecanismo de morte celular, muitas vezes da responsabilidade de vírus que, ao reforçar as suas defesas, prolongam a vida das próprias células que infectam, demonstrando um sofisticado balanço evolutivo (30).

Poder-se-á especular sobre um efeito semelhante nas células hepáticas produtoras de transtirretina mutada, responsáveis pela doença PAF, com base na maior expressão de Granzima B, que se sobrepõe aos efeitos da morte cerebral, mesmo num momento prévio à lesão de isquemia/reperusão.

Um argumento possível, para explicar este resultado nos enxertos provenientes de dadores com PAF, é a possibilidade de expressão de Granzima B em células linfóides não citolíticas (31) ou mesmo em células não linfóides (32). A expressão específica de Granzima B, mas não de perforina, nestes tipos celulares diferentes, sugere uma função não citotóxica, o que explicaria, também, a irrelevância da expressão de perforina no presente estudo.



A Granzima B é, portanto, mais expressa neste grupo de enxertos (grupo 3) em circunstâncias quase basais, em que o único estímulo é o início duma intervenção cirúrgica electiva, relativamente aos enxertos cadavéricos. Esta característica poderá traduzir um perfil molecular específico dos enxertos provenientes de doentes PAF, cujas eventuais consequências clínicas poderão ser avaliadas futuramente.

A **iNOS2A** obteve em T0 uma maior expressão nos enxertos do grupo 3, relativamente aos dos outros grupos ( $p=0.025$ ), diferença mais marcada entre o 1 e o 3 ( $p=0.022$ ). A iNOS2A mostrou ser mais expressada nos enxertos provenientes de dadores com PAF que nos cadavéricos, logo desde o início dos procedimentos do transplante, sem interferência de factores inerentes ao receptor.

O óxido nítrico tem propriedades antioxidantes e inibidoras da reacção inflamatória, prevenindo a infiltração por neutrófilos e reduzindo a produção de citocinas próinflamatórias (33). Para se considerarem os efeitos do óxido nítrico no fígado tem que se ter em conta que tanto a sua localização celular como a concentração vão ser determinantes na sua capacidade de interferir nas variadas vias de sinalização (34). Os seus efeitos no fígado podem ser benéficos, neutros ou prejudiciais, e estão dependentes da velocidade de síntese.

A isoforma de NOS considerada neste estudo é a que sintetiza óxido nítrico com mais alto débito (a iNOS2) e a que tem acção hepática menos elucidada. É expressada unicamente em resposta a endotoxinas e a citocinas pró inflamatórias (35). Tem múltiplas capacidades, como imunoreguladora, antitumoral e microbicida, mas como a sua disfunção está na génese de múltiplas patologias, tem uma regulação muito apertada (36). As características da sua actividade enzimática levam à produção de altas quantidades de óxido nítrico em curtos períodos de tempo, podendo actuar como radical livre e provocar lesão celular: stress nitrosactivo (37).

Neste grupo de enxertos (grupo 3) a expressão de iNOS é claramente superior à que ocorre nos outros grupos, em situação basal, ainda com a agressão mínima e previamente à clampagem; seria atraente explicar este facto, reconhecendo a maior

capacidade intrínseca deste tipo de enxerto para enfrentar a diminuição inevitável da concentração intracelular de óxido nítrico, à medida que a agressão da lesão de I/R progride, já amplamente reconhecida (38). Só que esta diminuição é devida ao decréscimo progressivo de óxido nítrico produzido pelas células do endotélio sinusoidal (da responsabilidade da eNOS e não da iNOS), aliada à inactivação de NO resultante das espécies reactivas de oxigénio. Portanto, a explicação do aumento relativo desta isoforma da NOS no momento T0 fica em aberto, uma vez que a sua expressão não é relevante em circunstâncias fisiológicas, e a sua acção no tecido hepático está reconhecidamente por esclarecer (39).

**Biopsia no final da isquémia fria (T1)** – Esta biopsia foi efectuada no final do procedimento cirúrgico denominado por trabalho de banca, ou em língua inglesa “back table”. Temporalmente, situa-se imediatamente antes da implantação do enxerto, não reflectindo, portanto, quaisquer efeitos da chamada segunda isquémia quente (ou período das anastomoses vasculares).

Analisando os resultados de expressão genética T1, verifica-se uma relativa ausência de diferenças relevantes entre os três grupos do total de 54 enxertos, relativamente à alocação. No painel de 12 genes, não se detectou nenhuma oscilação com significado estatístico, ou tendência evidente.

A maior expressão de iNOS2 em T1, nos enxertos do grupo 3 (enxerto PAF para receptor cirrótico) será comentada globalmente nos três momentos das biopsias, enquadrando o padrão evolutivo desta proteína, uma vez que o valor de p é relativamente alto ( $p=0.083$ ).

O efeito do arrefecimento do enxerto até à temperatura de cerca de 4°C não influenciou significativamente a expressão dos genes considerados no painel, quando correlacionados com a alocação dos enxertos. Também, a seguinte agressão sobre o enxerto não se traduziu nessa mesma expressão: o trabalho de banca (“back table”). Esse período de cerca de 60 a 90 minutos, apesar de se efectuar com

arrefecimento apropriado, conduz a um discreto aumento da temperatura dentro do fígado.

É interessante constatar a estabilidade no perfil molecular entre os vários enxertos neste tipo de correlação, uma vez que entre as duas biopsias consideradas (T0 e T1) decorrem agressões significativas sobre o fígado, a vários níveis:

- 1- manipulações cirúrgicas:** após a primeira biopsia, todo o procedimento de colheita multiorgânica envolve dissecções necessárias à exposição dos pedículos vasculares, canulações de grandes vasos, extracção dos órgãos, perfusão e dissecção em banca; segue-se o acondicionamento em sacos esterilizados e sua colocação em meios de transporte. Mesmo os enxertos do grupo 3 são submetidos a manipulações muito importantes, desde a hepatectomia, seguindo-se a inevitável reconstrução venosa supra hepática, e por vezes, a reconstrução da artéria hepática.
- 2- oscilações de temperatura:** toda a hepatectomia do dador decorre a temperaturas fisiológicas, descontando uma possível ligeira baixa, devida à condição de morte cerebral, nos dadores cadavéricos. No final da dissecção, consideram-se duas situações diferentes: dadores do **grupo 1 e 2** (cadavéricos) - são submetidos a clampagem da aorta, abertura do sistema venoso sistémico que permite a exsanguinação, envolvimento do fígado em gelo floculado e início da perfusão aórtica e portal com soluto de preservação. Idealmente, estes 4 gestos decorrem em simultâneo, evitando um curto período de isquemia quente, mas, em alguns casos, existem pequenos desfasamentos; dadores do **grupo 3** (PAF) – são submetidos a clampagem e secção da artéria hepática e da veia porta (nesta sequência), seguindo-se a secção das veias supra hepáticas. Neste caso, o arrefecimento é mais gradual, uma vez que, após este curto intervalo de isquemia quente, o escoamento do sangue intra hepático, o arrefecimento com gelo e a perfusão é feito *ex situ*. Segue-se o trabalho de banca (nunca inferior a uma média de 60 minutos nos três grupos de enxertos), acarretando nova oscilação da temperatura do enxerto, habitualmente não referida na literatura. O período

de isquemia fria que se segue até ao implante pode ainda traduzir-se em ligeira oscilação, no sentido de muito discreto arrefecimento

- 3- exsanguinação e perfusão com soluto de preservação:** nesta fase, a agressão sobre o enxerto decorre duma maneira diferente, consoante se trate de colheita multiorgânica ou colheita hepática isolada (grupo 3, e alguns enxertos do grupo 1 - dois casos - e grupo 2 - 1 caso). No primeiro caso, a exsanguinação é efectuada pela veia cava inferior, dentro da cavidade pericárdica, e decorre em simultâneo com a perfusão de soluto de preservação (Celsior) a cerca de 4°C, à pressão atmosférica. No segundo caso, a exsanguinação e a perfusão com Celsior é feita *ex vivo*, na banca (enxertos do grupo 3), ou é efectuada como na colheita multiorgânica, mas decorrendo em menos tempo.

Os procedimentos cirúrgicos da operação do dador cadavérico são descritos como a técnica rápida de Starzl, não existindo dissecção hilar hepática e permitindo uma colheita multiorgânica com brevidade (40). Nos dadores do grupo 3 (PAF) a técnica difere totalmente, com dissecção completa do fígado das suas conexões ligamentares, vasculares e biliar, sem clampagem da veia cava, em “Piggy Back” (41).

A hepatectomia nos enxertos do grupo 3 envolve uma manipulação maior que nos outros, e um período de isquemia quente (final da hepatectomia) em média superior ao dos grupos 1 e 2, a que se segue um trabalho de banca com duração média semelhante ao dos cadavéricos. Assim, considerando esta parcela do procedimento, o grau de agressão sobre o fígado de PAF não pode ser considerado menor que nos cadavéricos, mas mesmo assim não diverge no perfil genético de inflamação.

Ainda no grupo 3, a perfusão com Celsior e o envolvimento exterior com gelo pode permitir uma descida da temperatura no interior do órgão à semelhança dos casos com enxerto cadavérico, se bem que ainda não esteja demonstrado.

Assim, o procedimento de perfusão e arrefecimento de todos os 54 enxertos considerados, parece não ter demonstrado diferenças relevantes na expressão dos

genes do painel, aferindo a qualidade da técnica cirúrgica e a eficácia da solução de preservação.

O uso de Celsior justifica um comentário em relação à sua reduzida viscosidade (ausência de amido e de rafinose como impermeantes), permitindo perfusões mais rápidas em relação a outros solutos, como o UW (Viaspan®, Bristol-Myers Squibb Company), previamente utilizado pela nossa equipa. Se por um lado é desejável o efeito dum rápido arrefecimento do enxerto, medido pela sua temperatura interior (42), por outro, o escoamento muito rápido do soluto de perfusão não permite tempo suficiente à colheita de órgãos torácicos, obrigando, nessa eventualidade, a uma redução do seu débito, de forma a evitar um reaquecimento dos órgãos da cavidade abdominal.

Existe outra diferença importante entre as circunstâncias do trabalho de banca nos enxertos de dador com PAF (grupo 3) e nos enxertos cadavéricos: nestes últimos já decorreu tempo suficiente em meio envolvido em gelo para permitir alcançar uma temperatura central no enxerto entre 0.5 e 1°C, tida como ideal para a preservação hepática. Esta última observação foi demonstrada em experimentação animal, baseando-se, entre outros, em factores como o consumo de oxigénio, produção biliar e resistência hepática (43). Ao contrário, enquanto decorre o trabalho de banca de reconstruções vasculares nos enxertos de dador vivo de PAF, ainda não decorreu tempo suficiente para o arrefecimento até níveis óptimos sustentados (0.5 a 1°C), que, em fígado humano, está calculado em cerca de 3 horas em meio gelado (42). Parece ser relevante, em termos de implicações clínicas, manter a temperatura de preservação abaixo dos 4°C, porque, apesar de as bombas celulares de sódio e de potássio se desactivarem abaixo dos 20°C (44), àquela temperatura ainda se realizam algumas reacções proteolíticas (45).

Mesmo com estes constrangimentos temporais, os enxertos de dadores vivos (grupo 3) não sofreram qualquer alteração na expressão genética, relativamente aos cadavéricos. Os resultados justificam um futuro estudo das temperaturas intrahepáticas durante a isquémia fria dos enxertos de dador vivo, avaliando eventuais contrapartidas clínicas e laboratoriais.

**Biopsia pós reperfusão (T2)** – A biopsia pós reperfusão reflecte a agressão porventura mais importante de todo o procedimento em transplantação clínica, baseada no paradoxo da indução e agravamento da lesão tissular pelo restabelecimento da circulação, sendo a fase que impulsiona mais a investigação no sentido do potencial de intervenção terapêutica (46).

Com a reoxigenação do tecido hepático, resultante da desclampagem arterial e portal, dá-se início a uma complexidade de vias moleculares lesivas, mas também protectoras, iniciada pelas espécies reactivas de oxigénio (ROS). As ROS causam lesão celular directamente, mas também através da activação da cascata de mediadores que alteram a microcirculação sinusoidal, induzindo lesões inflamatórias, apoptose e necrose.

Existe uma distinção clássica entre a fase precoce pós reperfusão, até às 6 horas, e a fase tardia, mais de 12 horas. No entanto, é reconhecido que há suficiente sobreposição nas várias vias activadas que tornam esta divisão algo artificial, uma vez que as várias lesões evoluem em continuidade (47). É nesta amostragem (T2) que se depositavam as maiores expectativas sobre eventuais diferenças no desempenho molecular dos grupos de enxertos considerados (1, 2 e 3), uma vez que, neste protocolo, o momento T2 é o que encerra o somatório de lesões celulares.

A biopsia pós reperfusão revela apenas os dados precoces, uma vez que, por inerência do protocolo, as informações mais tardias não são contempladas neste trabalho. Tendo em linha de conta que as lesões pós reperfusão são mais expressivas à medida que o tempo passa, esta biopsia foi efectuada o mais tardiamente possível na cirurgia do receptor: decorreram, em média, cerca de três horas, antes da colheita dos fragmentos, na operação do receptor, durante o encerramento da parede abdominal.

A lesão hepática inicial pós reperfusão é o stress oxidativo, derivado da activação das células de Kupffer, e decorre precocemente, nas primeiras duas horas (48); o recrutamento de células imunocompetentes para o fígado é também um fenómeno precoce, que decorre cerca de uma hora após a desclampagem, com a acumulação

de linfócitos T CD4 (mas não CD8), precedendo as células do sistema imunitário inato (49); a maioria das citocinas próinflamatórias consideradas nos estudos sobre isquémia/reperfusão começam a ser expressadas na fase precoce, se bem que a sua acção atinja o valor máximo mais tardiamente, para além do limite presente das três horas (50).

O **Fasligando** em T2 revelou uma evidência de diferença entre a expressão no grupo 2 (menor) e o grupo 3 (maior), sem significado estatístico ( $p=0.034$ ):

Esta proteína transmembranar, ligando do receptor Fas, é responsável por grande parte da apoptose induzida sobre as células do fígado, pela chamada via extrínseca, ou do receptor de morte. Esta acção programada de morte celular é efectuada pelos linfócitos T citotóxicos. O receptor Fas está presente em todos os tipos de células hepáticas, tornando-as todas vulneráveis à via extrínseca de apoptose (51).

Não havendo diferenças nos tempos de isquémia fria entre os grupos de doentes relativos à alocação, a interpretação provável de alguma diferença assinalada entre os grupos no que respeita à expressão genética de Fasligando em T2, diz respeito a diferentes graus de apoptose das células endoteliais dos sinusóides hepáticos, uma vez que é este o grupo celular mais sensível à isquémia fria, mesmo abaixo das 8 horas (52). Refira-se que este efeito de menor resistência das células do endotélio sinusoidal à isquémia fria, verifica-se, essencialmente, nas áreas periportais, em comparação com as áreas centrolobulares (53).

Se bem que a diferença seja mínima, e, provavelmente, nada relevante clinicamente, esta evidência de diferença de expressão genética já poderá traduzir o efeito da patologia do receptor, menos favorável, neste aspecto, nos doentes com doença hepática crónica.

A **HO1** em T2 revelou uma diferença com significado estatístico entre a expressão no grupo 3, relativamente aos outros ( $p=0.019$ ), e entre os grupos 2 e 3 ( $p=0.022$ ).

É interessante assinalar que a expressão relativa desta citocina anti inflamatória ao longo dos momentos das três biopsias (T0, T1 e T2), evolui de maneira diferente nos enxertos do grupo 3 (de dador com PAF): enquanto a sua expressão vai diminuindo temporalmente nos enxertos cadavéricos, ela vai crescendo naquele grupo, em contraciclo e terminando com uma expressão bastante superior (Figura 2).

Este perfil na expressão temporal da HO1 foi já descrito em transplante hepático clínico, com valores progressivamente diminuídos em enxertos cadavéricos, contrastando com a evolução inversa no dador vivo, e com níveis mais elevados; no entanto, no mesmo estudo, de maneira diferente dos nossos resultados com enxerto de dador vivo PAF, a expressão de HO1 em T0 foi mais elevada em enxertos cadavéricos (54). A expressão de HO1 em T0 nos enxertos do grupo 3, não apresentou variações relativamente aos outros dois grupos, deixando em aberto a questão duma eventual supra regulação deste gene já neste momento. Esta interrogação parece pertinente, uma vez que está descrita a evidência de que os enxertos cadavéricos que menos expressam este gene em T0 são os que têm maior capacidade de o expressar na fase pós reperfusão, e os que demonstram menor lesão de isquémia reperfusão e melhor função (55).

Está descrito o efeito subletal da morte cerebral sobre os hepatocitos, provocando uma incapacidade para expressar níveis sustentados de HO1 como enzima citoprotectora, num conceito de exaustão celular ilustrado em modelo animal por um maior índice de apoptose nos enxertos cadavéricos (56). Esta expressão define, nesta amostragem, um perfil distinto nos enxertos de dadores com PAF relativamente aos cadavéricos, pela sua magnitude em T2 e pelas características da sua evolução temporal. Esta proteína, também conhecida como HSP32, é tipicamente expressada 3 ou mais horas após a reperfusão (57, 58), o que antevê a possibilidade de exacerbar esta diferença com o aumento do tempo decorrido pós reperfusão.

De acordo com as várias referências da literatura, esta enzima atenua a resposta inflamatória inerente à lesão de isquémia/reperfusão, o que confere uma



característica favorável nos enxertos onde a sua expressão é superior, tanto em modelos animais (59) como clínicos (60).

A heme oxigenase é o enzima que degrada o heme, produzindo uma quantidade equimolar de monóxido de carbono, biliverdina e ferro (61), e a sua isoenzima HO1 é regulada, não só pelo seu substrato heme, mas por estímulos oxidativos vários, hipóxia ou metais pesados (62). A sua indução é geralmente considerada uma resposta citoprotectora adaptada contra a toxicidade do stress oxidativo (63).

A acção anti-inflamatória da HO1 deve-se aos produtos do metabolismo do heme, biliverdina (convertida em bilirrubina),  $\text{Fe}^{2+}$  e monóxido de carbono (CO). Este último composto, a que se deve, porventura, a maior parte da acção citoprotectora e anti inflamatória da HO1, é considerado um potente anti-inflamatório, com potencialidades terapêuticas importantes, sobretudo através da introdução de moléculas libertadoras de CO (CO Releasing Molecules – CORMs), que, ao poderem ser administradas por via endovenosa, podem fornecer CO aos órgãos alvo, sem a toxicidade da sua forma gasosa (64).

A bilirrubina também tem potente acção anti-inflamatória e antioxidante, reconhecida através de revisões recentes, que a classificam como molécula protectora em situações patológicas ligadas ao stress oxidativo, nomeadamente em doença vascular, diabetes, síndrome metabólico e obesidade (65). Esta vantagem é atribuída às suas propriedades antioxidantes (66) e anti-inflamatórias (67), através de evidências experimentais, tanto em ensaios *in vitro* como *in vivo*. No âmbito da Epidemiologia está referido que níveis persistentemente elevados de bilirrubina sérica (Doença de Gilbert) estão associados a menor risco cardiovascular (68). Numa recente revisão dos efeitos da bilirrubina sérica no processo de aterosclerose, Kang et al. referem os estudos epidemiológicos que demonstram consistentemente que os níveis séricos de bilirrubina estão inversamente associados às doenças cardiovasculares, bem como aos factores de risco cardiovascular, como a síndrome metabólica e a diabetes. Esses estudos clínicos são reforçados por dados experimentais, tanto *in vivo* como *in vitro*, que demonstram a acção da bilirrubina como sequestradora de excesso de ROS (“scavenger”), inibidora da proliferação de

células do músculo liso vascular e como molécula anti-inflamatória (69). Também está amplamente referida na literatura a relação entre níveis ligeiramente elevados da bilirrubina sérica e menor risco de carcinoma colorectal: é descrita uma correlação inversa entre a prevalência daquela patologia e cada aumento da concentração de bilirrubina sérica em 10 mg/L, na população americana (70). Um estudo recente em modelo animal de transplante cardíaco também revelou uma atenuação da lesão de isquémia/reperfusão pela administração de bilirrubina *ex vivo* por lavagem dos enxertos antes da reperfusão (71).

O  $\text{Fe}^{2+}$ , obtido pela degradação do núcleo heme, induz a expressão de ferritina, proteína sequestradora de ferro, cuja homeostase intracelular contribui para o efeito antiapoptótico da HO1 (72).

A HO1 é considerada uma substância protectora vital, anti-inflamatória, anti-apoptótica e antiproliferativa, através das acções de um ou mais dos três catabolitos da degradação do heme; teorizou-se o conceito de “funil terapêutico” para ilustrar a sua eventual acção de modulação dos efeitos de outros compostos como a iNOS (73).

## 6.5. Análise comparativa entre expressão genética e histologia

Nesta análise comparativa, a divisão dos 54 doentes em dois grupos permitiu reunir um número de casos suficiente para extrair conclusões com significado estatístico, ou com alguma evidência de diferença. Assim, ao considerar o grupo em que o insulto isquémico teve maior tradução histológica, separado do grupo em que ela foi menor (ou nenhuma), permitiu seleccionar pequenas diferenças, acrescidas à análise puramente da expressão genética ou da leitura clássica das biopsias.

Há sempre que considerar que as duas variáveis de agressão celular aqui consideradas (histologia e expressão genética), espaçadas pelos três momentos das biopsias (T1, T2 e T3), podem evoluir temporalmente de forma diferente: determinada variação na expressão genética pode ser rápida demais para se traduzir

em alterações histológicas detectadas no mesmo momento. Por outro lado, a lesão histológica pode incidir em grupos celulares ou em aspectos morfológicos que não sejam detectados pela metodologia clássica, ou não contemplados na classificação utilizada. O facto de alguns parâmetros histológicos pontuados serem relativos apenas aos hepatocitos (como a esteatose), pode desvalorizar lesões que incidam mais noutras células hepáticas.

Desta comparação múltipla, tendo em conta os três momentos em que se realizaram as biopsias, apenas são dignas de menção diferenças nas expressões relativas de quatro genes do painel, e apenas uma com significado estatístico:

#### **IL - 1 $\beta$ em T0 (biopsia no princípio da operação de colheita, $p=0.025$ )**

A expressão deste gene revelou-se maior no grupo de enxertos com lesão histológica mais significativa (pontuação superior a 5), independentemente do tipo de dador. Este resultado confirma a habitual expressão mais elevada nos enxertos submetidos a maior agressão, também notado na análise isolada da expressão genética. Por ser expressada muito precocemente na lesão de isquémia/reperfusão, e por ser responsável pela regulação de muitas vias fundamentais na cascata pró inflamatória, a IL-1 $\beta$  pode contribuir para o início de lesões celulares, detectadas histologicamente logo em T0, onde, para além das consequências do estado de morte cerebral (enxertos de dador com PAF), só existe o estímulo inflamatório da manipulação hepática *in situ* (22).

Sendo uma molécula com potentes e muito precoces efeitos inflamatórios, a IL-1 $\beta$ , é fortemente regulada por vários mecanismos intracelulares, através de complexos multiproteicos denominados inflamossomas (74). Estes complexos regulam proteases (caspase 1) que por sua vez activam a sua forma inactiva (pro IL-1 $\beta$ ), podendo conduzir a uma forma específica de morte celular programada (piroptose), com forte componente inflamatório e estimulação do sistema imunitário inato (75).

Pela presente análise não se pode concluir que a menor expressão de IL-1 $\beta$ , é uma característica intrínseca de um tipo específico de enxerto, por alocação, uma vez que

os grupos por pontuação histológica contêm fígados de dador vivo de PAF e também cadavéricos; os resultados apenas indicam que existe uma correlação entre um padrão histológico menos favorável e um perfil molecular de maior expressão duma potente citocina pró inflamatória, reguladora de múltiplas vias de lesão celular, que apenas é evidenciada em situação basal (T0). Esta correlação não se prolonga pelos outros momentos observados (T1 e T2) mas poderia ser eventualmente detectada em momentos mais tardios (a partir das 3 horas de reperfusão), em que as consequências da isquémia/reperfusão se estabelecem melhor (76, 77).

Este resultado contém características importantes, que poderão ser desenvolvidas em futuros estudos, e, eventualmente, contribuir para acções terapêuticas anti-inflamatórias:

- correlaciona uma maior agressão tanto a nível molecular como a nível morfológico
- este perfil de maior agressão é independente do grupo, por alocação
- as lesões evidenciam-se antes da utilização do enxerto (T0), permitindo decidir a sua alocação,

#### **Selectina E (SELE) em T1 (biopsia pós isquémia fria, $p=0.038$ )**

A expressão deste gene revelou-se maior no grupo de enxertos com lesão histológica mais significativa (pontuação superior a 5), independentemente do tipo de dador. Este dado revela uma evidência de diferença, sem significado estatístico, que correlaciona a maior expressão desta molécula de adesão com uma lesão celular mais importante, histologicamente. É interessante verificar que a diferença aqui determinada não se tenha evidenciado na análise da expressão genética isolada, comparada nos três grupos de enxertos por alocação.

Mantendo-se livre de qualquer influência do receptor, o enxerto em T1 só reflecte as agressões até à segunda isquémia quente, nomeadamente os efeitos da isquémia fria.

A isquémia fria reflecte-se essencialmente no grupo celular hepático mais vulnerável aos efeitos do frio: as células endoteliais sinusoidais (15), com destacamento destas células da matriz perisinusoidal. As lesões das células endoteliais sinusoidais após a isquémia fria assemelham-se às verificadas nas fases precoces da angiogénese da cicatrização (78). Os sinusóides hepáticos contêm uma densa população de células de Kupffer, que, estimuladas pela hipóxia, produzem mediadores de angiogénese, a qual não se verifica, provavelmente em função da baixa temperatura: esses mediadores podem estimular maior destacamento das células endoteliais (79), mas sem acção pró apoptótica, uma vez que se admite que não pode haver apoptose em meios com baixa tensão de oxigénio (80).

Uma maior expressão de Selectina E pode corresponder a uma forma mais exacerbada de recrutamento de leucocitos, mas há indícios na literatura que sugerem um comportamento diferente do fígado, neste aspecto, com formas alternativas independentes da indução do rolamento dos leucocitos.

A via clássica de recrutamento leucocitário dos tecidos, com interacção pelas selectinas e integrinas com a consequente adesão firme ao endotélio parece não se verificar nalguns órgãos como o fígado, onde as células dos sinusóides não expressam Selectina E. No entanto, essa expressão e o consequente recrutamento leucocitário já se verifica nas vénulas pós sinusoidais (81). A acumulação de leucocitos ao nível dos sinusóides deve-se, provavelmente, a factores físicos da microcirculação, dado o calibre reduzido dos vasos a este nível, que se aproxima do seu próprio diâmetro (46).

### **Granzima B em T2 (biopsia pós reperfusão, $p=0.056$ )**

A expressão deste gene revelou-se maior no grupo de enxertos com lesão histológica mais significativa (pontuação superior a 5), independentemente do tipo de dador.

É interessante constatar que esta evidência de diferença entre os enxertos (sem significado estatístico) apenas se verifica nesta nova comparação, em que a variável é a lesão histológica, independentemente de ser proveniente de dador vivo ou não.

Para além disso, regista-se o facto desta evidência apenas ser demonstrada no momento de maior agressão celular (T2). Também deve ser referido que as expressões genéticas de Granzima B mais elevadas na biopsia pós reperusão foram registadas em doentes com infiltração neutrofílica maior (pontuação 1 ou 2).

Com subgrupos mais numerosos, seria possível fazer comparações, integrando esta última característica histológica com a maior expressão desta proteína responsável pela indução de apoptose.

Com base nestas observações, pode ainda referir-se como hipótese, a expressão da Granzima B pela população de neutrófilos intra hepática (82), para além doutros grupos celulares.

#### **HO1 em T0 (biópsia no início da operação de colheita, $p=0.056$ )**

A expressão deste gene revelou-se maior no grupo de enxertos com lesão histológica mais significativa (pontuação superior a 5), independentemente do tipo de dador.

Sem significado estatístico, esta evidência de diferença pode traduzir o efeito da alta sensibilidade da regulação positiva deste gene protector em situações de maior estímulo pró inflamatório associado a stress oxidativo, neste caso a manipulação hepática acrescida ao efeito de agressão da morte cerebral (83, 84).

Usando também um modelo clínico, mas com fígado parcial, Weiss et al. demonstraram que a indução de HO1 em biopsias de enxertos cadavéricos era apenas detectada imediatamente após a laparotomia (T0), efeito associado a uma infiltração linfocitária superior em análise imuno-histoquímica (54).

A singularidade no presente estudo (dador vivo com fígado inteiro e proveniente de dador PAF) pode evidenciar aspectos diferentes do modelo acima descrito, mas exhibe uma tendência semelhante na expressão deste gene, associada a critérios da histologia clássica.

## 6.6. Resultados clínicos gerais

Utilizaram-se, como variável resposta, a presença/ausência de disfunção do enxerto e as complicações (Dindo/Clavien), respeitantes aos resultados clínicos precoces. A longo prazo, determinaram-se a mortalidade, a rejeição crónica e o número de reinternamentos.

**Disfunção do enxerto** – Esta variável resposta está relacionada directamente com a sobrevida do enxerto (85).

Analisando os resultados relativos à presença de disfunção do enxerto, constata-se que a classificação de E.A.D. (Early Allograft Dysfunction – Critérios de definição de disfunção precoce) foi a mais abrangente, considerando a quase totalidade de casos interpretados como tal (15 dos 16 totais). Entre as três classificações de disfunção do enxerto apresentadas, esta é a única validada em função de estudos multicêntricos na era do M.E.L.D., sendo mais recente e contemplando mais variáveis, considerando o período crítico dos primeiros sete dias de pós operatório (86). Regista-se na literatura uma incidência de cerca de 23%, não muito diferente da registada no presente estudo (16 doentes – 29%), e com o paralelismo dos registos mais frequentes se deverem aos níveis altos de bilirrubina e aminotransferases.

Com a preocupação de se tentar definir quais os factores de risco que conduzam à disfunção do enxerto, estão em curso estudos contemplando outros biomarcadores e estudos genómicos (Clinical Trials in Organ Transplantation, [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)).

Apesar da escassez da amostra, destaca-se o facto de se registar menor percentagem de disfunção nos enxertos do grupo 3 (16%) relativamente aos outros grupos, por alocação, sendo a maior percentagem registada no grupo 2 (40%): as características intrínsecas dos enxertos bem como as diferentes agressões a que foram submetidos podem contribuir para a justificação destas diferenças. A ausência do efeito de morte cerebral torna os enxertos do grupo 3 intrinsecamente diferentes, o que se pode reflectir no seu desempenho. Os do grupo 2, tendo sido alocados a receptores com PAF, reflectem preferencialmente os efeitos sistémicos e

hemodinâmicos desta patologia, dada a inexistência de diferenças significativas nos registos dos dadores e na operação de colheita (idade, histologia, tempos de isquémia).

**Complicações** - Ao contrário, a contabilidade respeitante às complicações registadas não demonstra diferenças percentuais relevantes entre os mesmos grupos, podendo desde já demonstrar essencialmente o efeito dominante das características do receptor. Salienta-se o facto de existir alguma redundância entre as definições adoptadas de disfunção do enxerto e de complicações: segundo a classificação de Dindo – Clavien, a disfunção do enxerto é incluída nos respectivos graus (2A). No entanto, as definições não são coincidentes, explicando assim a discrepância entre o número de doentes contabilizados com disfunção do enxerto (16 doentes) e os contabilizados com complicações 2A, pela mesma causa (6 doentes).

A percentagem de doentes com complicações foi superior a 50% nos três grupos, traduzindo um processo cirúrgico sempre acompanhado por alta morbilidade precoce, apesar de quase todos do grau 2. Não foram registadas complicações de grau 1, dadas as habituais características autolimitadas (87), e pela inexistência de referências nos respectivos processos.

**Correlações entre os critérios de disfunção do enxerto e as complicações** - Estes resultados clínicos indicam uma correlação importante entre a verificação de disfunção do enxerto e a existência de complicações de grau 2 ou superiores: na presente amostra de 16 doentes em apenas 3 não se registaram complicações (23%), reforçando a importância daquela característica na previsão do prognóstico (88).

As complicações registadas ocorreram, na sua maioria, em receptores de enxertos em que não se registou disfunção precoce (20, num total de 32 doentes), com etiologias multifactoriais, provavelmente sem relação directa com a agressão precoce sobre o enxerto.

Pela escassez dos números, não se podem extrair, neste ponto, conclusões relacionadas com a distribuição das complicações pelo tipo de enxerto por alocação.



**Número de reinternamentos** - Este parâmetro reflecte a evolução clínica a médio e longo prazo, sendo habitualmente referido como muito relevante em estudo de seguimento (89). Para além dos factores que se devem ao tipo de enxerto e ao estado clínico do receptor, está relacionado com variáveis doutra ordem, como a aderência à medicação e às recomendações pós operatórias (“compliance”), com uma incidência avaliada entre 15 e 40%, para a medicação, e entre 3 e 47% para a comparência às consultas de seguimento (90).

**Morte do receptor e rejeição crónica** - Ao associar estas duas variáveis, contempla-se, também, a falência do enxerto e a necessidade de retransplante. Contabilizaram-se, tanto os óbitos no pós operatório (um caso entre 54) como os relacionados directamente, ou não, com o transplante (respectivamente 4 e 5 casos). A mortalidade baixa deve-se à relativa homogeneidade do conjunto dos 54 receptores, poucos casos de indicações de urgência e de retransplante, bem como à boa qualidade da generalidade dos dadores. Registaram-se, até ao momento, apenas 3 casos de rejeição crónica (5.5%), em conformidade com os dados actuais da literatura (4 a 8%), que em grande parte se deve à maior eficácia dos esquemas de imunossupressão e ao melhor conhecimento da história natural das patologias consideradas (91).

## **6.7. Resultados relacionados com a variável resposta disfunção do enxerto**

### **6.7.1. Resultados clínicos**

**Grupo por alocação e receptor com diagnóstico de PAF** - Os resultados comparativos entre o grupo do enxerto , por alocação, e a variável disfunção, revelam uma maior probabilidade desta ocorrência se o receptor tiver o diagnóstico de PAF (grupo 2 por alocação). Essa tendência é demonstrada numericamente por duas evidências:

- se a comparação for feita entre os enxertos do grupo 1 e 2, estes últimos demonstram o dobro de probabilidades da ocorrência de disfunção (razão de probabilidades de 2.078).

- se a comparação for feita entre os receptores com diagnóstico de PAF e os receptores com outras patologias, aqueles demonstraram quase o triplo (razão de probabilidades de 2.9) de probabilidades da ocorrência de disfunção.

A maior probabilidade de ocorrência de disfunção do enxerto limita-se, nestes resultados, à característica PAF do receptor, porque probabilidade oposta foi demonstrada em relação à característica PAF do próprio enxerto: no grupo 3, os receptores evidenciaram um efeito protector, com menor probabilidade de disfunção do enxerto (razão de probabilidades de 0.2 quando comparados com o grupo 1). Revendo as características dos doentes com este diagnóstico (grupo 2) e os respectivos transplantes, sistematizam-se as possíveis justificações para estes resultados em dois grupos:

I - relacionadas com os enxertos – pela prática habitual do CHBPT – HCC, aos receptores com PAF são habitualmente alocados enxertos de cadáver com características mais favoráveis: dadores mais jovens e sem critérios expandidos. Este facto deve-se às próprias características dos receptores, também mais jovens, e com a função hepática preservada, tornando o transplante um procedimento electivo, o que, por sua vez, torna possível o seguimento para transplante sequencial ou dominó. Pelo contrário, pelas suas excelentes características, esses dadores cadavéricos são habitualmente seleccionados para colheita multiorgânica, incluindo órgãos torácicos e por vezes também para colheita de pâncreas: toda essa logística obriga muitas vezes a tempos acrescidos de manutenção do dador, maiores tempos de isquémia quente durante a colheita (não contabilizados) e consequentes oscilações da temperatura do fígado, com possíveis consequências negativas (92).

II - relacionadas com os receptores – as consequências hemodinâmicas da disautonomia presente estão amplamente descritas na literatura (93, 94), sendo habituais os episódios intraoperatórios de hipotensão, mesmo desencadeados por estímulos mínimos (95). Duas alterações hemodinâmicas podem interferir na maior

incidência de disfunção do enxerto no simultaneamente receptor/dador PAF: os períodos de hipotensão sistémica e os de hipertensão pulmonar. Estes dois parâmetros hemodinâmicos são os únicos associados independentemente com mau prognóstico cirúrgico (96). Também há que ter em conta que os receptores com PAF são simultaneamente dadores, o que os torna um grupo particular de doentes. Este facto não confere, segundo a literatura, consequências negativas no curto prazo, para o doente PAF, quer se utilize circulação extracorporeal (97), quer seja utilizada a técnica com preservação da veia cava (“duplo piggyback”, (41)), como neste grupo de doentes do CHBPT – HCC. No entanto, apesar do uso sistemático da técnica de piggyback, em certas circunstâncias (suprahepáticas mais curtas ou períodos de maior basculação hepática), a clampagem das supra hepáticas pode ocluir completamente o fluxo da veia cava, podendo reduzir o débito cardíaco até 50% (98) com consequências importantes e imprevisíveis (99), estando interrelacionadas as oscilações de citocinas pró inflamatórias e o perfil hemodinâmico durante o transplante hepático (100).

**Género do receptor** – A razão de possibilidades de 0.313 confere ao receptor do género masculino (42 doentes) uma protecção três vezes maior relativamente ao género feminino (12 doentes), em relação à disfunção do enxerto. A discrepância entre o sexo do dador e do receptor pode estar relacionada no presente resultado (11 em 12). Existem escassas referências na literatura relativamente à discordância de géneros neste ponto. Os resultados menos bons são quase sempre relatados relativamente à sobrevida do enxerto. A maior evidência descrita é sobretudo o pior prognóstico da combinação receptor masculino com enxerto feminino (101-103), mas os argumentos apresentados dizem respeito ao dador, alguns dos quais respeitantes ao ambiente hormonal e à sua acção sobre os colangiócitos (104). A única patologia apontada como directamente relacionada com discrepâncias de sobrevida do enxerto relativamente ao género do receptor é a doença hepática crónica a vírus C (105), em que o género feminino é um predictor independente de evolução para a fibrose progressiva e perda do enxerto (106). No entanto este factor não se aplica a estes resultados, uma vez que no grupo de 12 receptores do género

feminino, apenas uma apresentava aquele diagnóstico. Ainda, há registos relativamente ao mau prognóstico em receptores do género feminino que receberam enxertos do sexo oposto, considerado um factor de risco independente para não funcionamento primário (“primary non function”, (107)). Genericamente, se bem que as causas estejam ainda por explicar, existem razões imunológicas para as diferenças relacionadas com géneros diferentes entre dador/receptor: o papel de antígenos menores de histocompatibilidade, como o antígeno H-Y, codificado por genes do cromossoma Y, é referido na literatura, ainda sem confirmação (108).

**Duração dos tempos de isquémia** – A possibilidade de se verificar disfunção do enxerto duplicou a partir de 500 minutos de isquémia fria e de 60 minutos de isquémia quente. Essa possibilidade subiu para 5 vezes se o tempo de isquémia quente ultrapassasse os 90 minutos. Estes valores estão em conformidade com os dados da literatura, se bem que o principal parâmetro avaliado seja, quase sempre, a sobrevida do enxerto. O valor de 12 horas de isquémia fria é o habitualmente adoptado por muitos dos centros de transplantação hepática como o limite máximo aceitável como seguro (4), outros apontando as 10 horas como limite (109), sendo o valor de 8 horas referido como o valor máximo que pode equiparar resultados a longo prazo com dadores acima e abaixo de 50 anos (110). O tempo máximo de isquémia quente registado como seguro no CHBPT-HCC foi de 60 minutos, não havendo registo operativo, em todos os casos, da sua relação com o tempo de fase anhepática. Esta relação é apontada como importante na definição de factor de risco independente, sendo apontado como limiar máximo de fase anhepática um valor entre 92 e 117 minutos (111). Outras séries apontam o valor acima de 55 minutos de isquémia quente como duplicando o risco de mortalidade (109).

**Complicações (Dindo – Clavien)** – Nos receptores em que se registaram complicações no pós operativo, a possibilidade coexistir disfunção do enxerto foi cerca de 4 vezes superior em relação aos receptores sem complicações (32 doentes com complicações, dos quais 13 registaram também disfunção do enxerto). Esta

relação era expectável, de acordo com os estudos multicêntricos, publicados por vários grupos (112).

**Dias de U.C.I. e de Internamento** – A razão de possibilidades para a disfunção do enxerto foi importante (mais de 7 vezes) quando os internamentos excederam os 6 dias, valor semelhante a outros estudos (113). Este valor traduz, para além da gravidade relativa dos respectivos pós operatórios, uma evolução multifactorial no sentido do encurtamento, relativamente ao período considerado desde o início do estudo. Tal evolução foi semelhante noutros centros (114), reflectindo também factores como a extubação precoce dos doentes (115). Assim se pode presumir que, actualmente, o número de dias na U.C.I. a partir do qual a razão de possibilidades aumenta, é provavelmente inferior ao que foi determinado pelos presentes dados. A análise dos dias de internamento até à alta não revelou quaisquer diferenças relativamente a maior possibilidade de disfunção do enxerto.

**Tempo operatório** – A razão de possibilidades de disfunção do enxerto relativamente ao tempo operatório foi de 2,5 vezes, a partir de 350 minutos. Este tempo (quase 6 horas) está acima da demora média dum transplante hepático sem complicações, realizado no CHBPT-HCC, ou na generalidade dos Centros a nível mundial (116). Uma demora média acima dos 350 minutos ilustra, na maioria dos casos no nosso Centro, o tempo de hemóstase após o implante do enxerto.

#### 6.7.2. Resultados laboratoriais

**Pontuação histológica** – As razões de possibilidades de disfunção do enxerto referentes à pontuação adoptada, revelou uma progressão com a gravidade da lesão observada (4,4 e 7 vezes, consoante pontuação entre 2 e 5 e acima de 10, respectivamente), notando-se, curiosamente, um patamar nessa progressão para pontuações entre 5 e 10. Tentando interpretar estas variações e comparando com as

respectivas lesões histológicas consideradas, a transição de lesões reversíveis para irreversíveis poderá contribuir para este resultado numérico. Nesta linha interpretativa, assinala-se também, que as duas únicas lesões histológicas que contribuíram para o aumento das razões de possibilidades foram as que são irreversíveis: balonização e necrose. Os valores altos das razões de possibilidades, vêm comprovar a importância que as observações morfológicas têm na apreciação global da LIR.

**Balonização nas biópsias em T0 e T1** – Nos dois momentos referidos, registou-se uma razão de possibilidades alta de disfunção do enxerto (3,5 e 7,5, respectivamente), quando existe balonização dos hepatocitos. Demonstra que as consequências desta lesão são maiores no final da isquémia fria, apesar da maior resistência dos hepatocitos ao insulto isquémico, relativamente a outros tipos celulares hepáticos (117). Esta lesão deve-se à depleção de ATP e a um aumento do cálcio intracelular, conduzindo à perda do controle volumétrico pela membrana plasmática e à disrupção do sistema de filamentos intermédios do hepatocito, podendo levar à morte celular (118), conferindo características de irreversibilidade no respectivo tecido (119).

**Necrose nas biópsias em T0 e T1** – As razões de possibilidades de disfunção do enxerto obtidas relativamente à presença de necrose, foram ligeiramente menores em relação às obtidas relativamente à balonização. Um indicador de lesão irreversível, designa-se também como necrose oncótica (120). Também, como na balonização, a depleção de ATP e o aumento de cálcio intracelular têm um papel fundamental, destruindo o citoesqueleto e alterando a permeabilidade em ambas as membranas das mitocôndrias (121). O valor predictivo das biópsias histológicas quanto ao desenvolvimento de disfunção do enxerto está amplamente descrito na literatura (122), sobretudo na fase pré colheita, e considerando a presença de necrose como um possível factor de exclusão da utilização do enxerto (123).

**Expressão de Selectina E e de Interleucina 1 Beta em T0** – Comparando as expressões de IL-1 $\beta$ , e de SELE, no instante T0 (biopsia no início da colheita) com a variável resposta disfunção do enxerto, verifica-se uma associação entre esta variável e as expressões maiores destes dois genes. Pela análise univariável, essa associação só sobressai com estes dois genes, entre todos os do painel selecionado, e, pela análise multivariável, apenas com a SELE.

Esta molécula de adesão participa no recrutamento de neutrófilos através dum sistema de interações sequenciais, pelo qual condiciona um abrandamento da velocidade circulatória dos leucócitos entre 100 e 1000 vezes, estabelecendo ligações pouco firmes, utilizando glicoproteínas como ligandos, num fenómeno inicial referido como ligações de recrutamento (“catch bonds”) (124) entre estas células sanguíneas e as células endoteliais que expressam o seu gene. Seguem-se ligações mais fortes às células endoteliais, permitindo o rolamento neutrofílico (125).

Ao contrário doutras selectinas, a Selectina E é expressada numa forma induzida, não em situações basais, mas em resposta a estímulos pró inflamatórios, tanto crónicos como agudos, pelas células endoteliais, mas não nos sinusóides hepáticos (126). Entre esses estímulos, para além doutras citocinas pró-inflamatórias, consta a IL-1 $\beta$ , molécula que está envolvida nas fases precoces da cascata inflamatória (127).

Curiosamente, a associação entre estes dois genes proinflamatórios e a maior tendência para a disfunção do enxerto, só foi documentada no instante T0, ainda sem a interferência dos factores relacionados com o receptor. É reconhecido que qualquer intervenção cirúrgica encerra uma agressão molecular pela simples manipulação hepática, através da activação das células de Kupffer (128), pelo que é expectável que os enxertos expressem, logo no momento T0, moléculas pró inflamatórias, responsáveis, entre múltiplas acções, pela mobilização de neutrófilos, como as selectinas (129).

A maior expressão de IL-1 $\beta$ , e de SELE, no instante T0 (biopsia no início da colheita) associada com a variável resposta disfunção do enxerto, representa uma implicação clínica com potencialidades terapêuticas. A expressão basal de IL-1 $\beta$  já tinha revelado, no presente estudo, uma correlação estatística com o padrão de agressão histológica, ganhando maior relevância com a presente associação com a disfunção do enxerto.

Outro dado relevante do presente trabalho, que deve ser correlacionado nesta discussão, foi a menor infiltração neutrofílica em T0 nos enxertos provenientes de dadores vivos PAF, sem a agressão dos mecanismos de morte cerebral (ver resultados histológicos). A conjugação destas evidências, aponta para que os enxertos com maiores consequências inflamatórias sejam os que mais expressam genes de activação do endotélio e os que exibem maior infiltração neutrofílica.

#### **6.8. Resultados relacionados com a variável resposta complicações**

Os resultados referentes às comparações segundo a classificação adoptada (Dindo – Clavien) traduzem as características das complicações registadas: dos 32 doentes em que se verificaram, 28 tiveram complicações do tipo 2. Analisando individualmente, as etiologias incluem quase sempre causas cirúrgicas, em que não é possível estabelecer uma relação com as características do enxerto ou da patologia do receptor. As várias análises efectuadas, obtiveram alguns resultados inconclusivos, que se afastam das comparações com outras variáveis resposta:

- Género masculino, com uma razão de possibilidades superior a 4 relativamente ao feminino (das 4 complicações registadas em receptores do género feminino, 3 foram do tipo 2 – disfunção do enxerto)
- Idade do dador inferior a 50 anos, com uma razão de possibilidades de 3.08

Nas outras variáveis que registaram diferenças, houve um paralelismo com os resultados obtidos com outras variáveis dependentes:

- Isquémia fria > 500 minutos, com uma razão de possibilidades de 7,72



- Disfunção do enxerto, com uma razão de possibilidades de 3,9
- Reinternamentos iguais ou superior a 2, com uma razão de possibilidades de 5,17 na análise multivariável

Pelas suas características, os resultados clínicos comparados com a variável dependente **complicações** não assumiram valores conclusivos na globalidade do estudo, reforçado pelo facto de não se terem registado diferenças dignas de nota na vertente laboratorial, quer histológica quer molecular.

#### 6.9. Resultados relacionados com a variável resposta número de reinternamentos igual ou superior a dois

A comparação entre todas as variáveis consideradas, clínicas ou laboratoriais e a variável dependente **número de reinternamentos igual ou superior a dois**, não revelou qualquer significado estatístico. Apenas se notou evidência de diferença, em termos clínicos, considerando três variáveis, que se interrelacionam: complicações e dias de internamento, esta última tanto na análise univariável como na multivariável.

Seria previsível a associação verificada entre as três variáveis referidas, levando algumas complicações a prolongar o primeiro internamento, e, eventualmente, a condicionar futuros reinternamentos.

Do ponto de vista laboratorial, verificou-se uma evidência de diferença, relacionando o maior número de internamentos com uma variável histológica (a **esteatose**) e outra molecular (a expressão de **Granzima B** em condições basais – T0). São apenas estas duas referências que são destacadas na análise multifactorial, se bem que contrariamente ao que seria previsível: ambas com leve tendência protectora. Aliás, noutras observações no presente trabalho, estas duas variáveis surgem com a mesma tendência (resultados de GrzB em T0 nos enxertos tipo 3, e esteatose não associada a pior sobrevida). Na reduzida amostra de 54 casos, deve referir-se, pelo menos, a ausência duma acção desfavorável daquele gene em certas vias da LIR,

sugerindo uma justificação possível na produção de GrzB em células não linfóides, com significado ainda por esclarecer, como anteriormente comentado (32).

A esteatose no enxerto será comentada no ponto seguinte, pela associação registada em duas das variáveis dependentes.

#### 6.10. Resultados relacionados com a variável resposta tempo decorrido até à morte do receptor ou rejeição crónica do enxerto

Em relação a esta variável dependente, registou-se uma diferença com significado estatístico em análise multivariável, para a variável clínica **tempo do primeiro internamento** ( $p=0.004$ ), ilustrando uma forte relação entre as duas.

Uma associação, ilustrada por evidência de diferença, registou-se, tal como noutras comparações com outras variáveis dependentes, para o género (masculino protector) idade maior do receptor, tempo de isquémia fria superior a 500 minutos, existência de complicações e disfunção do enxerto.

As diferenças registadas relativamente às características laboratoriais, atribuíram um efeito lesivo à maior expressão de Fasligando em T0, e um efeito protector à presença de esteatose, este último em análise multifactorial e com significado estatístico ( $p=0.004$ ).

A relação entre a expressão de Fasligando e uma evolução clínica menos boa, pela menor sobrevida do enxerto e do receptor, aponta para uma acção sem a influência do receptor, uma vez que essa evidência se verifica apenas em T0. Contrariamente ao que se verificou na expressão genética desta molécula em T2, em que existiu uma expressão diferente, consoante o grupo de enxertos por alocação, a maior expressão basal de Fasligando parece associar-se, só por si, a uma evolução clínica pior. Esta correlação pode ser devida, provavelmente, à estimulação precoce de subpopulações específicas de células T, actuando independentemente da estimulação por antígenos, induzindo apoptose em fases posteriores à reperfusão. (130).

A presença de esteatose associada a uma maior sobrevivência do receptor e do enxerto demonstra que o efeito desta característica histológica é compensado por várias outras características favoráveis, que acabam por se sobrepor, determinando uma acção positiva no desempenho do enxerto. Primeiramente, existiu um critério muito selectivo na escolha dos dadores, sobretudo na primeira fase temporal em que se efectuou o estudo, com grande precaução na utilização de enxertos com esteatose, não ultrapassando, geralmente, 20%. Este limiar associou tanto a macro como a microesteatose, cujas consequências poderão ser diferentes (131, 132). Existem múltiplos estudos na literatura, demonstrando que uma vez ultrapassadas as diferenças de perfusão nos primeiros 7 dias pós transplante hepático, a sobrevida do enxerto e do receptor à distância não é afectada pela presença de macroesteatose (133). As alterações causadas na microcirculação hepática na esteatose envolvem estreitamento nos sinusóides, com deposição de colagénio no espaço de Disse, activação de neutrófilos intrahepáticos e activação das células estreladas (134).

Estudos recentes apontam para um modelo relativamente seguro de utilização de enxertos com macroesteatose, denominado Balanço de Risco (BAR). Este modelo integra 5 factores inerentes ao dador e ao receptor, originando uma pontuação específica, crescente consoante o maior risco (135). Com pontuações abaixo de 18, os enxertos com índices de macroesteatose até 30% obtiveram sobrevidas aos 5 anos iguais aos dos que não tinham esteatose (14). No entanto, nos casos de utilização de enxertos com graus moderados de esteatose, tem de se antecipar a alta probabilidade da multiplicação dos custos hospitalares por mais de cinco vezes (comentário por Jan Lerut em (14), por vezes demonstrado através duma relação precisa entre percentagem de esteatose e tempos de internamento, tanto hospitalar como na U.C.I. (136).

Do total de 54 doentes do estudo, 27 apresentavam esteatose, e, entre esses, apenas 5 apresentavam esteatose considerada moderada (que ultrapassava os 30%), todos eles com pontuação de BAR bem inferior a 18, diluindo completamente qualquer efeito prejudicial da presença daquele factor, acabando por realçar outras características favoráveis, quer do dador quer do receptor.

## Referências

1. Bispo M, Marcelino P, Marques HP, Martins A, Perdigoto R, Aguiar MJ, et al. Domino versus deceased donor liver transplantation: association with early graft function and perioperative bleeding. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2011;17(3):270-8.
2. Bulawa CE, Connelly S, Devit M, Wang L, Weigel C, Fleming JA, et al. Tafamidis, a potent and selective transthyretin kinetic stabilizer that inhibits the amyloid cascade. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2012;109(24):9629-34.
3. Reichert B, Becker T, Weismuller TJ, Kleine M, Zachau L, Johanning K, et al. Value of the preoperative SOFT-score, P-SOFT-score, SALT-score and labMELD-score for the prediction of short-term patient and graft survival of high-risk liver transplant recipients with a pre-transplant labMELD-score  $\geq 30$ . *Annals of transplantation : quarterly of the Polish Transplantation Society*. 2012;17(2):11-7.
4. Adam R, Bismuth H, Diamond T, Ducot B, Morino M, Astarcioglu I, et al. Effect of extended cold ischaemia with UW solution on graft function after liver transplantation. *Lancet*. 1992;340(8832):1373-6.
5. Spitzer AL, Lao OB, Dick AA, Bakthavatsalam R, Halldorson JB, Yeh MM, et al. The biopsied donor liver: incorporating macrosteatosis into high-risk donor assessment. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2010;16(7):874-84.
6. Lisman T, Caldwell SH, Burroughs AK, Northup PG, Senzolo M, Stravitz RT, et al. Hemostasis and thrombosis in patients with liver disease: the ups and downs. *Journal of hepatology*. 2010;53(2):362-71.
7. Kappus MR, Sanyal AJ. *Coagulopathy: pathophysiology, evaluation, and treatment – Liver anesthesiology and critical care medicine*: Springer; 2012.
8. Howard TK, Klintmalm GB, Cofer JB, Husberg BS, Goldstein RM, Gonwa TA. The influence of preservation injury on rejection in the hepatic transplant recipient. *Transplantation*. 1990;49(1):103-7.
9. Rosen HR, Martin P, Goss J, Donovan J, Melinek J, Rudich S, et al. Significance of early aminotransferase elevation after liver transplantation. *Transplantation*. 1998;65(1):68-72.
10. Ploeg RJ, D'Alessandro AM, Knechtle SJ, Stegall MD, Pirsch JD, Hoffmann RM, et al. Risk factors for primary dysfunction after liver transplantation--a multivariate analysis. *Transplantation*. 1993;55(4):807-13.
11. Skrabal CA, Thompson LO, Potapov EV, Southard RE, Joyce DL, Youker KA, et al. Organ-specific regulation of pro-inflammatory molecules in heart, lung, and kidney following brain death. *The Journal of surgical research*. 2005;123(1):118-25.

12. Koneru B, Dikdan G. Hepatic steatosis and liver transplantation current clinical and experimental perspectives. *Transplantation*. 2002;73(3):325-30.
13. Durand F, Renz JF, Alkofer B, Burra P, Clavien PA, Porte RJ, et al. Report of the Paris consensus meeting on expanded criteria donors in liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2008;14(12):1694-707.
14. Dutkowski P, Schlegel A, Slankamenac K, Oberkofler CE, Adam R, Burroughs AK, et al. The use of fatty liver grafts in modern allocation systems: risk assessment by the balance of risk (BAR) score. *Annals of surgery*. 2012;256(5):861-8; discussion 8-9.
15. McKeown CM, Edwards V, Phillips MJ, Harvey PR, Petrunka CN, Strasberg SM. Sinusoidal lining cell damage: the critical injury in cold preservation of liver allografts in the rat. *Transplantation*. 1988;46(2):178-91.
16. Krishna M. Microscopic anatomy of the liver. *Clinical Liver Disease*. 2013;2(S1):S4-S7.
17. Family F, Mazzitello KI, Arizmendi CM, Grossniklaus HE. Dynamic scaling of lipofuscin deposition in aging cells. *Journal of Statistical Physics*. 2011;144(2):332-43.
18. Lotowska JM, Sobaniec-Lotowska ME, Bockowska SB, Lebensztejn DM. Pediatric non-alcoholic steatohepatitis: The first report on the ultrastructure of hepatocyte mitochondria. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2014;20(15):4335-40.
19. Le TH, Caldwell SH, Redick JA, Sheppard BL, Davis CA, Arseneau KO, et al. The zonal distribution of megamitochondria with crystalline inclusions in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2004;39(5):1423-9.
20. Derenzini M, Olins AL, Olins DE. Chromatin structure in situ: the contribution of DNA ultrastructural cytochemistry. *European journal of histochemistry : EJH*. 2014;58(1):2307.
21. Bai J, Odin JA. Apoptosis and the liver: relation to autoimmunity and related conditions. *Autoimmunity reviews*. 2003;2(1):36-42.
22. van den Broek MA, Shiri-Sverdlov R, Schreurs JJ, Bloemen JG, Bieghs V, Rensen SS, et al. Liver manipulation during liver surgery in humans is associated with hepatocellular damage and hepatic inflammation. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2013;33(4):633-41.
23. Schemmer P, Schoonhoven R, Swenberg JA, Bunzendahl H, Thurman RG. Gentle in situ liver manipulation during organ harvest decreases survival after rat liver transplantation: role of Kupffer cells. *Transplantation*. 1998;65(8):1015-20.
24. Viana J, Bento C, Vieira H, Neves S, Seco C, Elvas L, et al. Haemodynamics during liver transplantation in familial amyloidotic polyneuropathy: study of the intraoperative cardiocirculatory data of 50 patients. *Revista Portuguesa de Cardiologia*. 1999;18(7-8):689-97.
25. van den Broek MA, Bloemen JG, Dello SA, van de Poll MC, Olde Damink SW, Dejong CH. Randomized controlled trial analyzing the effect of 15 or 30 min intermittent Pringle maneuver on hepatocellular damage during liver surgery. *Journal of hepatology*. 2011;55(2):337-45.

26. Watts RP, Thom O, Fraser JF. Inflammatory signalling associated with brain dead organ donation: from brain injury to brain stem death and posttransplant ischaemia reperfusion injury. *Journal of transplantation*. 2013;2013:521369.
27. Corbitt N, Kimura S, Isse K, Specht S, Chedwick L, Rosborough BR, et al. Gut bacteria drive Kupffer cell expansion via MAMP-mediated ICAM-1 induction on sinusoidal endothelium and influence preservation-reperfusion injury after orthotopic liver transplantation. *The American journal of pathology*. 2013;182(1):180-91.
28. Koudstaal LG, Ottens PJ, Uges DR, Ploeg RJ, van Goor H, Leuvenink HG. Increased intestinal permeability in deceased brain dead rats. *Transplantation*. 2009;88(3):444-6.
29. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature reviews Immunology*. 2002;2(10):735-47.
30. Ploegh HL. Viral strategies of immune evasion. *Science*. 1998;280(5361):248-53.
31. Ebnet K, Levelt CN, Tran TT, Eichmann K, Simon MM. Transcription of granzyme A and B genes is differentially regulated during lymphoid ontogeny. *The Journal of experimental medicine*. 1995;181(2):755-63.
32. Chowdhury D, Lieberman J. Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annual review of immunology*. 2008;26:389-420.
33. Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *Journal of investigative surgery : the official journal of the Academy of Surgical Research*. 2009;22(1):46-55.
34. Hill BG, Dranka BP, Bailey SM, Lancaster JR, Jr., Darley-Usmar VM. What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(26):19699-704.
35. Xia C, Misra I, Iyanagi T, Kim JJ. Regulation of interdomain interactions by calmodulin in inducible nitric-oxide synthase. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(44):30708-17.
36. Pautz A, Art J, Hahn S, Nowag S, Voss C, Kleinert H. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society*. 2010;23(2):75-93.
37. Knott AB, Bossy-Wetzel E. Nitric oxide in health and disease of the nervous system. *Antioxidants & redox signaling*. 2009;11(3):541-54.
38. Koken T, Inal M. The effect of nitric oxide on ischemia-reperfusion injury in rat liver. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1999;288(1-2):55-62.
39. Siriussawakul A, Zaky A, Lang JD. Role of nitric oxide in hepatic ischemia-reperfusion injury. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2010;16(48):6079-86.
40. Starzl TE, Iwatsuki S, Esquivel CO, Todo S, Kam I, Lynch S, et al. Refinements in the surgical technique of liver transplantation. *Seminars in liver disease*. 1985;5(4):349-56.
41. Barroso E. Transplante hepático sequencial com preservação da veia cava inferior (técnica de duplo piggyback). Tese de Doutorado. 2012;Lisboa.
42. Hertl M, Howard TK, Lowell JA, Shenoy S, Robert P, Harvey C, et al. Changes in liver core temperature during preservation and rewarming in human and porcine liver allografts.

Liver transplantation and surgery : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society. 1996;2(2):111-7.

43. Charrueau C, Neveux N, Chaumeil JC, Hannoun L, Cynober L, Savier E. Best temperature for static liver graft storage is 1 degrees C. The Journal of surgical research. 2013;180(2):322-9.

44. Raison JK. The influence of temperature-induced phase changes on the kinetics of respiratory and other membrane-associated enzyme systems. Journal of bioenergetics. 1973;4(1):285-309.

45. Laidler KJ, Peterman BF. Temperature effects in enzyme kinetics. Methods in enzymology. 1979;63:234-57.

46. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. International review of cell and molecular biology. 2012;298:229-317.

47. Datta G, Fuller BJ, Davidson BR. Molecular mechanisms of liver ischemia reperfusion injury: insights from transgenic knockout models. World journal of gastroenterology : WJG. 2013;19(11):1683-98.

48. Lentsch AB. Regulatory mechanisms of injury and repair after hepatic ischemia/reperfusion. Scientifica. 2012;2012:513192.

49. Caldwell CC, Okaya T, Martignoni A, Husted T, Schuster R, Lentsch AB. Divergent functions of CD4+ T lymphocytes in acute liver inflammation and injury after ischemia-reperfusion. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology. 2005;289(5):G969-76.

50. Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology. 2003;284(1):G15-26.

51. Faubion WA, Gores GJ. Death receptors in liver biology and pathobiology. Hepatology. 1999;29(1):1-4.

52. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Reperfusion injury to endothelial cells following cold ischemic storage of rat livers. Hepatology. 1989;10(3):292-9.

53. Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. Transplantation. 1999;67(8):1099-105.

54. Weiss S, Kotsch K, Francuski M, Reutzel-Selke A, Mantouvalou L, Klemz R, et al. Brain death activates donor organs and is associated with a worse I/R injury after liver transplantation. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2007;7(6):1584-93.

55. Geuken E, Buis CI, Visser DS, Blokzijl H, Moshage H, Nemes B, et al. Expression of heme oxygenase-1 in human livers before transplantation correlates with graft injury and function after transplantation. American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2005;5(8):1875-85.

56. Van Der Hoeven JA, Moshage H, Schuurs T, Nijboer M, Van Schilfgaarde R, Ploeg RJ. Brain death induces apoptosis in donor liver of the rat. *Transplantation*. 2003;76(8):1150-4.
57. Shen XD, Ke B, Zhai Y, Gao F, Busuttil RW, Cheng G, et al. Toll-like receptor and heme oxygenase-1 signaling in hepatic ischemia/reperfusion injury. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2005;5(8):1793-800.
58. Su H, van Dam GM, Buis CI, Visser DS, Hesselink JW, Schuurs TA, et al. Spatiotemporal expression of heme oxygenase-1 detected by in vivo bioluminescence after hepatic ischemia in HO-1/Luc mice. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2006;12(11):1634-9.
59. Ben-Ari Z, Issan Y, Katz Y, Sultan M, Safran M, Michal LS, et al. Induction of heme oxygenase-1 protects mouse liver from apoptotic ischemia/reperfusion injury. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2013;18(5):547-55.
60. Wu CW, Yu J. Heme oxygenase-1 induction: the anti-inflammatory regime in organ transplant. *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2012;27(4):621-2.
61. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1968;61(2):748-55.
62. Alam J, Igarashi K, Immenschuh S, Shibahara S, Tyrrell RM. Regulation of heme oxygenase-1 gene transcription: recent advances and highlights from the International Conference (Uppsala, 2003) on Heme Oxygenase. *Antioxidants & redox signaling*. 2004;6(5):924-33.
63. Vijayan V, Mueller S, Baumgart-Vogt E, Immenschuh S. Heme oxygenase-1 as a therapeutic target in inflammatory disorders of the gastrointestinal tract. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2010;16(25):3112-9.
64. Foresti R, Bani-Hani MG, Motterlini R. Use of carbon monoxide as a therapeutic agent: promises and challenges. *Intensive care medicine*. 2008;34(4):649-58.
65. Erlinger S, Arias IM, Dhumeaux D. Inherited Disorders of Bilirubin Transport and Conjugation: New Insights Into Molecular Mechanisms and Consequences. *Gastroenterology*. 2014.
66. Rigato I, Ostrow JD, Tiribelli C. Bilirubin and the risk of common non-hepatic diseases. *Trends in molecular medicine*. 2005;11(6):277-83.
67. Vitek L, Schwertner HA. The heme catabolic pathway and its protective effects on oxidative stress-mediated diseases. *Advances in clinical chemistry*. 2007;43:1-57.
68. Schwertner HA, Vitek L. Gilbert syndrome, UGT1A1\*28 allele, and cardiovascular disease risk: possible protective effects and therapeutic applications of bilirubin. *Atherosclerosis*. 2008;198(1):1-11.
69. Kang SJ, Lee C, Kruzliak P. Effects of serum bilirubin on atherosclerotic processes. *Annals of medicine*. 2014;46(3):138-47.
70. Zucker SD, Horn PS, Sherman KE. Serum bilirubin levels in the U.S. population: gender effect and inverse correlation with colorectal cancer. *Hepatology*. 2004;40(4):827-35.



71. Bosch F, Thomas M, Kogler P, Oberhuber R, Sucher R, Aigner F, et al. Bilirubin rinse of the graft ameliorates ischemia reperfusion injury in heart transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2014;27(5):504-13.
72. Ferris CD, Jaffrey SR, Sawa A, Takahashi M, Brady SD, Barrow RK, et al. Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cellular iron. *Nature cell biology*. 1999;1(3):152-7.
73. Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends in immunology*. 2003;24(8):449-55.
74. Gross O, Thomas CJ, Guarda G, Tschopp J. The inflammasome: an integrated view. *Immunological reviews*. 2011;243(1):136-51.
75. Bergsbaken T, Fink SL, Cookson BT. Pyroptosis: host cell death and inflammation. *Nature reviews Microbiology*. 2009;7(2):99-109.
76. Caldwell-Kenkel JC, Currin RT, Tanaka Y, Thurman RG, Lemasters JJ. Kupffer cell activation and endothelial cell damage after storage of rat livers: effects of reperfusion. *Hepatology*. 1991;13(1):83-95.
77. Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Velez DA, Hewan-Lowe KO, Guyton RA, et al. Dynamic progression of contractile and endothelial dysfunction and infarct extension in the late phase of reperfusion. *The Journal of surgical research*. 2000;94(2):133-44.
78. Gao W, Washington MK, Bentley RC, Clavien PA. Antiangiogenic agents protect liver sinusoidal lining cells from cold preservation injury in rat liver transplantation. *Gastroenterology*. 1997;113(5):1692-700.
79. Clavien PA. Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. *Hepatology*. 1998;28(2):281-5.
80. Stefanelli C, Stanic I, Bonavita F, Muscari C, Pignatti C, Rossoni C, et al. Oxygen tension influences DNA fragmentation and cell death in glucocorticoid-treated thymocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 1995;212(2):300-6.
81. Liu L, Kubes P. Molecular mechanisms of leukocyte recruitment: organ-specific mechanisms of action. *Thrombosis and haemostasis*. 2003;89(2):213-20.
82. Wagner C, Iking-Konert C, Denefleh B, Stegmaier S, Hug F, Hansch GM. Granzyme B and perforin: constitutive expression in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood*. 2004;103(3):1099-104.
83. Choi AM, Alam J. Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 1996;15(1):9-19.
84. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 1997;37:517-54.
85. Pokorný H, Gruenberger T, Soliman T, Rockenschaub S, Langle F, Steininger R. Organ survival after primary dysfunction of liver grafts in clinical orthotopic liver transplantation. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2000;13 Suppl 1:S154-7.

86. Olthoff KM, Kulik L, Samstein B, Kaminski M, Abecassis M, Emond J, et al. Validation of a current definition of early allograft dysfunction in liver transplant recipients and analysis of risk factors. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2010;16(8):943-9.
87. Clavien PA, Camargo CA, Jr., Croxford R, Langer B, Levy GA, Greig PD. Definition and classification of negative outcomes in solid organ transplantation. Application in liver transplantation. *Annals of surgery*. 1994;220(2):109-20.
88. Briceno J, Ciria R. Early graft dysfunction after liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 2010;42(2):631-3.
89. Foxton MR, Al-Freah MA, Portal AJ, Sizer E, Bernal W, Auzinger G, et al. Increased model for end-stage liver disease score at the time of liver transplant results in prolonged hospitalization and overall intensive care unit costs. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2010;16(5):668-77.
90. Burra P, Germani G, Gnoato F, Lazzaro S, Russo FP, Cillo U, et al. Adherence in liver transplant recipients. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2011;17(7):760-70.
91. Neuberger J. Incidence, timing, and risk factors for acute and chronic rejection. *Liver transplantation and surgery : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 1999;5(4 Suppl 1):S30-6.
92. Schenk M, Zipfel A, Fischer-Froehlich CL, Lauchart W, Viebahn R. Does the process of multiorgan harvesting influence the quality of a liver graft? *Organs Tissues & Cells*. 2001;2:87-9.
93. Castro Tavares J, Maciel L. Anaesthetic management of a patient with familial amyloid polyneuropathy of the Portuguese type. *Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthesie*. 1989;36(2):209-11.
94. Latson TW, Ashmore TH, Reinhart DJ, Klein KW, Giesecke AH. Autonomic reflex dysfunction in patients presenting for elective surgery is associated with hypotension after anesthesia induction. *Anesthesiology*. 1994;80(2):326-37.
95. Viana JS, Vieira H, Bento C, Neves S, Seco C, Furtado AL. Intraoperative management of liver transplantation for familial amyloid polyneuropathy Met30: what has changed in the last 10 years? *Transplantation proceedings*. 2003;35(3):1121-2.
96. Reich DL, Wood RK, Jr., Emre S, Bodian CA, Hossain S, Krol M, et al. Association of intraoperative hypotension and pulmonary hypertension with adverse outcomes after orthotopic liver transplantation. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia*. 2003;17(6):699-702.
97. Azoulay D, Salloum C, Samuel D, Plante-Bordeneuve V. Operative risks of domino liver transplantation for the FAP liver donor and the FAP liver recipient. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis*. 2012;19 Suppl 1:73-4.

98. Moulding R, Picton P. Caval Cross-Clamping, Piggyback, and Veno-Venous Bypass. In: Wagener G, editor. *Liver Anesthesiology and Critical Care Medicine*. New York: Springer; 2012.
99. Carmichael FJ, Lindop MJ, Farman JV. Anesthesia for hepatic transplantation: cardiovascular and metabolic alterations and their management. *Anesthesia and analgesia*. 1985;64(2):108-16.
100. Arranz J, Soriano A, Garcia I, Garcia I, Concepcion MT, Navarro J, et al. Effect of proinflammatory cytokines (IL-6, TNF-alpha, IL-1beta) on hemodynamic performance during orthotopic liver transplantation. *Transplantation proceedings*. 2003;35(5):1884-7.
101. Brooks BK, Levy MF, Jennings LW, Abbasoglu O, Vodapally M, Goldstein RM, et al. Influence of donor and recipient gender on the outcome of liver transplantation. *Transplantation*. 1996;62(12):1784-7.
102. Rustgi VK, Marino G, Halpern MT, Johnson LB, Umana WO, Tolleris C. Role of gender and race mismatch and graft failure in patients undergoing liver transplantation. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2002;8(6):514-8.
103. Croome KP, Segal D, Hernandez-Alejandro R, Adams PC, Thomson A, Chandok N. Female donor to male recipient gender discordance results in inferior graft survival: a prospective study of 1,042 liver transplants. *Journal of hepato-biliary-pancreatic sciences*. 2014;21(4):269-74.
104. Alvaro D, Mancino MG, Onori P, Franchitto A, Alpini G, Francis H, et al. Estrogens and the pathophysiology of the biliary tree. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2006;12(22):3537-45.
105. Norvell JP, Levitsky MD. Donor and recipient effects on graft and patient survival. *Clinical Liver Disease*. 2013;2(4):152-5.
106. Lai JC, Verna EC, Brown RS, Jr., O'Leary JG, Trotter JF, Forman LM, et al. Hepatitis C virus-infected women have a higher risk of advanced fibrosis and graft loss after liver transplantation than men. *Hepatology*. 2011;54(2):418-24.
107. Varotti G, Grazi GL, Vetrone G, Ercolani G, Cescon M, Del Gaudio M, et al. Causes of early acute graft failure after liver transplantation: analysis of a 17-year single-centre experience. *Clinical transplantation*. 2005;19(4):492-500.
108. Candinas D, Gunson BK, Nightingale P, Hubscher S, McMaster P, Neuberger JM. Sex mismatch as a risk factor for chronic rejection of liver allografts. *Lancet*. 1995;346(8983):1117-21.
109. Busuttil RW, Farmer DG, Yersiz H, Hiatt JR, McDiarmid SV, Goldstein LI, et al. Analysis of long-term outcomes of 3200 liver transplantations over two decades: a single-center experience. *Annals of surgery*. 2005;241(6):905-16; discussion 16-8.
110. Reese PP, Sonawane SB, Thomasson A, Yeh H, Markmann JF. Donor age and cold ischemia interact to produce inferior 90-day liver allograft survival. *Transplantation*. 2008;85(12):1737-44.
111. Ijtsma AJ, van der Hilst CS, de Boer MT, de Jong KP, Peeters PM, Porte RJ, et al. The clinical relevance of the anhepatic phase during liver transplantation. *Liver transplantation :*

official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society. 2009;15(9):1050-5.

112. Deschenes M, Belle SH, Krom RA, Zetterman RK, Lake JR. Early allograft dysfunction after liver transplantation: a definition and predictors of outcome. National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases Liver Transplantation Database. Transplantation. 1998;66(3):302-10.

113. Croome KP, Hernandez-Alejandro R, Chandok N. Early allograft dysfunction is associated with excess resource utilization after liver transplantation. Transplantation proceedings. 2013;45(1):259-64.

114. Busuttil RW, Shaked A, Millis JM, Jurim O, Colquhoun SD, Shackleton CR, et al. One thousand liver transplants. The lessons learned. Annals of surgery. 1994;219(5):490-7; discussion 8-9.

115. Mandell MS, Lezotte D, Kam I, Zamudio S. Reduced use of intensive care after liver transplantation: influence of early extubation. Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society. 2002;8(8):676-81.

116. Sampedro B, Cabezas J, Fabrega E, Casafont F, Pons-Romero F. Liver transplantation with donors older than 75 years. Transplantation proceedings. 2011;43(3):679-82.

117. Okouchi Y, Sasaki K, Tamaki T. Ultrastructural changes in hepatocytes, sinusoidal endothelial cells and macrophages in hypothermic preservation of the rat liver with University of Wisconsin solution. Virchows Archiv : an international journal of pathology. 1994;424(5):477-84.

118. Crawford J, Alastair Burt A. Anatomy, pathophysiology and basic mechanisms of disease. In: Houston M, editor. MacSween's Pathology of the Liver. 6th ed. China: Churchill Livingstone, Elsevier; 2012.

119. Fickert P, Trauner M, Fuchsbichler A, Zollner G, Wagner M, Marschall HU, et al. Oncosis represents the main type of cell death in mouse models of cholestasis. Journal of hepatology. 2005;42(3):378-85.

120. Malhi H, Guicciardi ME, Gores GJ. Hepatocyte death: a clear and present danger. Physiological reviews. 2010;90(3):1165-94.

121. Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? Hepatology. 2006;43(2 Suppl 1):S31-44.

122. D'Alessandro AM, Kalayoglu M, Sollinger HW, Hoffmann RM, Reed A, Knechtle SJ, et al. The predictive value of donor liver biopsies for the development of primary nonfunction after orthotopic liver transplantation. Transplantation. 1991;51(1):157-63.

123. Markin RS, Wisecarver JL, Radio SJ, Stratta RJ, Langnas AN, Hirst K, et al. Frozen section evaluation of donor livers before transplantation. Transplantation. 1993;56(6):1403-9.

124. Thomas W. For catch bonds, it all hinges on the interdomain region. The Journal of cell biology. 2006;174(7):911-3.

125. Smith CW. 3. Adhesion molecules and receptors. The Journal of allergy and clinical immunology. 2008;121(2 Suppl):S375-9; quiz S414.

126. Coito AJ. Leukocyte transmigration across endothelial and extracellular matrix protein barriers in liver ischemia/reperfusion injury. *Current opinion in organ transplantation*. 2011;16(1):34-40.
127. Futosi K, Fodor S, Mocsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *International immunopharmacology*. 2013;17(3):638-50.
128. Schemmer P, Enomoto N, Bradford BU, Bunzendahl H, Raleigh JA, Lemasters JJ, et al. Activated Kupffer cells cause a hypermetabolic state after gentle in situ manipulation of liver in rats. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2001;280(6):G1076-82.
129. Kolaczowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(3):159-75.
130. Rao J, Lu L, Zhai Y. T cells in organ ischemia reperfusion injury. *Current opinion in organ transplantation*. 2014;19(2):115-20.
131. Fishbein TM, Fiel MI, Emre S, Cubukcu O, Guy SR, Schwartz ME, et al. Use of livers with microvesicular fat safely expands the donor pool. *Transplantation*. 1997;64(2):248-51.
132. Zamboni F, Franchello A, David E, Rocca G, Ricchiuti A, Lavezzo B, et al. Effect of macrovesicular steatosis and other donor and recipient characteristics on the outcome of liver transplantation. *Clinical transplantation*. 2001;15(1):53-7.
133. Angele MK, Rentsch M, Hartl WH, Wittmann B, Graeb C, Jauch KW, et al. Effect of graft steatosis on liver function and organ survival after liver transplantation. *American journal of surgery*. 2008;195(2):214-20.
134. Farrell GC, Teoh NC, McCuskey RS. Hepatic microcirculation in fatty liver disease. *Anatomical record*. 2008;291(6):684-92.
135. Dutkowski P, Oberkofler CE, Slankamenac K, Puhan MA, Schadde E, Mullhaupt B, et al. Are there better guidelines for allocation in liver transplantation? A novel score targeting justice and utility in the model for end-stage liver disease era. *Annals of surgery*. 2011;254(5):745-53; discussion 53.
136. Doyle MB, Vachharajani N, Wellen JR, Anderson CD, Lowell JA, Shenoy S, et al. Short- and long-term outcomes after steatotic liver transplantation. *Archives of surgery*. 2010;145(7):653-60.



## 7. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

No presente trabalho foram utilizadas duas classificações na previsão do risco (SOFT e BAR), sem obtenção de diferenças com significado estatístico, muito provavelmente por ser uma amostra reduzida e com subgrupos relativamente homogêneos.

Pelo aumento de doentes com doença PAF em lista de espera para transplante hepático, este diagnóstico tornou-se uma das principais indicações para aquele procedimento no programa do CHBPT-HCC. Este facto, associado à necessidade de expansão do número de enxertos disponíveis, desenvolveu a transplantação sequencial, como uma solução harmoniosa para os dois problemas. Uma das particularidades do nosso programa de transplantação, foi gerar as três situações clínicas anteriormente descritas, com os três tipos de enxertos, que designámos como 1, 2 e 3 consoante a combinação dador/receptor. Em cada uma destas três situações clínicas, existem especificidades, algumas delas evidenciadas no presente trabalho, que devem ser consideradas.

**Receptor cirrótico e enxerto cadavérico (tipo 1)** - Constitui a situação clínica mais frequente. Conclui-se:

- A expressão de IL 1 $\beta$  em T0 foi a maior dos três grupos ( $p=0.076$ ), o que adquire maior significado pela constatação da associação entre maior expressão deste gene e maior dano histológico, com significado estatístico ( $p=0.025$ ). Neste grupo, a utilização de uma das classificações de risco adquire mais importância, uma vez que os enxertos provenientes de dadores com critérios expandidos são habitualmente aqui incluídos.
- As constatações deste trabalho, tanto referentes ao intra operatório (maior consumo de hemoderivados), como referentes às características histológicas e moleculares (maior expressão basal de uma das mais potentes citocinas pró inflamatórias) chamam a atenção para factores, tanto do dador como do

receptor: nesta alocação, não existe nem o factor protector do enxerto (como nos dadores vivos) nem o factor protector da patologia do receptor (como nos PAFs, com melhores índices de sobrevivência) (1, 2).

**Receptor PAF e enxerto cadavérico (tipo 2)** – O diagnóstico de PAF no receptor pode ser uma indicação para transplante hepático, com a intenção de travar a progressão da doença (3), ou, como alternativa ao tratamento médico com Tafamidis (4).

- As consequências histológicas de todo o procedimento colheita/transplante foram menores neste grupo, com significado estatístico, traduzindo, eventualmente, um efeito protector do diagnóstico PAF no receptor, uma vez que as características gerais dos enxertos eram semelhantes ( $p=0.023$ ).
- Este efeito protector do diagnóstico PAF no receptor, também se verificou relativamente à menor expressão genética de Fasligando (molécula implicada na indução de apoptose) em T2 nestes enxertos, comparativamente com todos os outros. Constatou-se nos receptores com PAF, uma maior razão de possibilidades de evolução para a disfunção do enxerto, relacionado com os vários factores intraoperatórios da doença por si, e com a simultaneidade colheita/transplante.
- As curvas de sobrevivência foram melhores nestes doentes, relativamente aos outros diagnósticos (5). Constatou-se neste grupo de 15 doentes, um caso de complicação trombótica sistémica (acidente isquémico transitório), não se tendo verificado nenhum caso de trombose dos vasos hepáticos: (a maior incidência de complicações trombóticas foi descrita pelo nosso grupo anteriormente (6).

**Receptor Cirrótico e enxerto PAF (tipo 3)** – evidenciaram-se características próprias nos enxertos PAF (tipo 3), tanto clínicas como laboratoriais (7):

- Houve, como já foi referido, menor consumo de hemoderivados durante o transplante, relativamente às outras situações de alocação.
- A menor infiltração neutrofílica em T0 nestes enxertos, também se evidenciou.



- A expressão genética de Granzima B em T0 foi maior que nos outros grupos.
- A expressão genética de iNOS em T0 foi maior que nos outros grupos.
- A expressão genética de HO1 em T2 foi maior que nos outros grupos
- A expressão genética de FasLigando foi maior que nos outros grupos

No entanto, as suas desvantagens são conhecidas e descritas na literatura, pela possibilidade de evolução para uma transmissão da doença PAF aos receptores, num período temporal relativamente curto (8). Desconhecem-se, no entanto, as circunstâncias pelas quais essa evolução clínica é variável de caso para caso, sugerindo-se alguns factores predisponentes: a idade avançada, neuropatia prévia de outra etiologia e a terapêutica imunossupressora (9).

O perfil molecular deste tipo de enxertos denota uma maior expressão de alguns genes pró inflamatórios (Granzima B em situações basais (T0), sem interferência do efeito do receptor, e FAS-L em T2). No entanto, o facto de, também em T0 demonstrar uma menor infiltração por neutrófilos e expressar mais iNOS, sugere uma característica de protecção às agressões (10). Mais relevante é a análise da expressão do gene da HO1, reconhecidamente um dos sistemas de protecção celular a vários níveis , como já referido, com expressão crescente ao longo das agressões, com pico máximo em T2, sugerindo uma maior capacidade de defesa (11).

As constatações gerais relativas às variáveis resposta demonstram alguns resultados relevantes:

- **Disfunção do enxerto** – esta variável identificou diferenças importantes em relação com o **género**, sendo o masculino uma característica protectora, provavelmente ligada à discrepância de género entre o dador e o receptor. Curiosamente, esta tendência confirmou-se, também, na análise de sobrevivência. Os **tempos de isquémia** também se revelaram como características ligadas àquela variável resposta, sendo as possibilidades maiores registadas a partir de 500 minutos para a isquémia fria, e 90 minutos para a isquémia quente. A existência de **complicações** (12) também se definiu como

relacionada com a disfunção do enxerto, tal como estadias de mais de 6 **dias em U.C.I.** e **tempos operatórios** superiores a 350 minutos. Histologicamente, estabeleceu-se uma relação entre a disfunção do enxerto e **pontuações maiores**, evidência de **balonização** e de **necrose**. Em termos de expressão genética, as expressões basais de **IL-1 $\beta$** , e de **SELE**, foram as que se evidenciaram como relacionadas com disfunção do enxerto: este facto realça não só o papel importante da mobilização precoce de neutrófilos, como a importância da expressão destes dois genes como característica intrínseca, nos desempenhos menos favoráveis do enxerto hepático

- **Complicações** – Relativamente a esta variável, evidenciou-se a isquémia fria superior a 500 minutos, a disfunção do enxerto e o número de reinternamentos superior ou igual a 2, como as características relacionadas.
- **Número de reinternamentos** – Complicações e dias de internamento foram os dois factores clínicos que se relacionaram com a variável resposta reinternamentos igual ou superior a 2. Não se evidenciou qualquer associação desfavorável entre a esteatose e a expressão de Granzima B em T0, relativamente a maior tendência a reinternamentos.
- **Sobrevivência** – Relacionou-se uma sobrevida menor com maior tempo do primeiro internamento, sexo feminino e idade do receptor, existência de complicações, disfunção do enxerto e mais de 500 minutos de isquémia fria. Em termos laboratoriais, assinala-se o efeito prejudicial de maior expressão basal de FAS-L e a ausência de efeito deletério da esteatose, pelo menos nos níveis ligeiros/moderados constatados.

## CONCLUSÕES FINAIS

Todo o processo de colheita e transplante hepático contribui, em termos variáveis, para a inevitabilidade da lesão de isquémia/reperfusão. Existem sempre dois tipos de factores que se avaliam previamente ao início de todo o procedimento: factores do **DADOR** e factores do **RECEPTOR**. É esta dualidade que vai definir se a LIR adquire características relevantes para o sucesso do procedimento, tanto no curto como no

longo prazo.

Na multiplicidade de factores descritos na literatura (13), o presente trabalho chamou a atenção para algumas, escassas, características, identificadas como índices menos favoráveis, a considerar, nalgumas circunstâncias, tanto quanto a escassez e a relativa homogeneidade da amostra permite concluir:

- Género feminino do receptor (sobretudo associado a enxerto masculino)
- Isquémia fria superior a 500 minutos
- Isquémia quente superior a 90 minutos

Na análise laboratorial, distinguiram-se as duas características histológicas desfavoráveis e irreversíveis como índice de mau prognóstico: a necrose e a balonização; no painel genético escolhido neste estudo, a expressão basal de **SELE**, de **FAS-L** e de **IL-1 $\beta$** , relacionaram-se com pior prognóstico, este último correlacionado também com maior lesão histológica.

Algumas características protectoras intrínsecas dos enxertos, só se revelaram indirectamente, como foi o caso da menor infiltração neutrofílica e da maior expressão de HO1 e de iNOS nos enxertos PAF, sem ter sido possível provar uma interferência directa nos resultados clínicos, como seria expectável. Refira-se, ainda, a impossibilidade de se obter expressão mensurável de genes anti-inflamatórios nas biopsias hepáticas processadas neste estudo, como a IL13 e a IL4. Assim, com a metodologia utilizada, não foi possível obter um perfil de expressão genética associado a boa evolução clínica. Contrariamente, o perfil inverso foi sugerido apenas pela expressão basal dos 3 genes mencionados (**FAS-L**, **SELE** e sobretudo **IL-1 $\beta$** ) no mesmo painel, com o protocolo seguido, neste conjunto de 54 doentes.

O diagnóstico de **PAF no receptor** determinou uma maior predisposição para a disfunção do enxerto, o que, por sua vez, determina uma menor sobrevida. No entanto, o diagnóstico de PAF no receptor exhibe uma curva de sobrevida mais favorável: neste caso, as características do receptor sobrepuseram-se às do enxerto.

Os receptores com um baixo balanço de risco definiram características favoráveis

para enxertos com níveis baixos e moderados de **esteatose**, fazendo que esta característica, definida como um risco acrescido, não só não se manifestasse clinicamente, como parecesse um factor favorável: novamente neste ponto, as características do receptor sobrepujaram-se às do enxerto.

Das variáveis clínicas e laboratoriais identificadas como desfavoráveis e podendo comprometer o resultado global do transplante, nenhuma se evidenciou em todas as variáveis resposta escolhidas, e apenas uma se verificou em três delas: o **tempo de isquémia fria superior a 500 minutos**, em relação à disfunção do enxerto, complicações, e sobrevida. Nesta correlação, esta característica sobrepôs-se às do receptor.

As variáveis laboratoriais descritas como associadas a uma evolução menos favorável (**Balonização e Necrose, FAS-L, IL-1 $\beta$  e SELE em T0**), apenas se relacionaram directamente com uma das variáveis resposta adoptadas, porventura a mais relevante: a **disfunção do enxerto**. Só uma outra se relacionou com outra variável resposta, e só com ela: a maior expressão de **FAS-L em T0**.

Relacionando todos os factores, é sugerido que existe quase sempre um equilíbrio entre os inerentes ao receptor e os do enxerto, como as duas faces da mesma moeda. Só existe preponderância de um dos lados, quando há diminuição do oposto.

A relevância dos parâmetros laboratoriais parece ser importante apenas em circunstâncias de desequilíbrios, quando os factores clínicos, amplamente descritos na literatura, são ultrapassados: poderá ser o caso de circunstâncias mais extremas, como enxertos provenientes de dadores com critérios expandidos, ou de dadores em assistolia. A metodologia apresentada neste trabalho poderá ser reproduzida clinicamente com interferência directa na decisão de alocação apenas em casos que permitissem respostas em tempo útil, como no caso das alterações reveladas logo na biópsia T0, ou em estudo de pares dador/receptor com dador vivo, PAF ou fígado parcial.

A expressão precoce de **IL-1 $\beta$**  pode ser utilizada como marcador da qualidade do enxerto, à luz dos resultados revelados no presente estudo, sendo a terapêutica

anti-inflamatória dirigida a esta citocina já amplamente utilizada em várias situações clínicas de cronicidade chamadas doenças auto-inflamatórias (14), existindo muitas condições clínicas inflamatórias agudas que justificariam este tipo de terapêutica, por envolverem LIR: oclusão coronária aguda ou outras situações tromboembólicas, síndrome compartimental pós fasciotomia ou em preservação de órgãos colhidos para transplante (15).

A utilização de antagonistas da interleucina 1 no tratamento da isquemia em órgãos transplantados é também sugerida por Dinarello e col., numa revisão sobre aquelas possíveis actuações terapêuticas (16). Este tipo de terapêutica foi introduzido em 1993 com a Anakinra, um bloqueador da IL-1 $\alpha$  e da IL-1 $\beta$ , evoluindo com a introdução de anticorpos monoclonais, alguns já utilizados na prática clínica (Canakinumab), outros em fase experimental (Gevokizumab). Este último composto encontra-se em ensaios clínicos de fase 2, podendo vir a ser utilizado como potente anti-inflamatório em áreas muito diversas como a Oftalmologia, a Reumatologia, a Diabetes, a Cardiologia e a Nefrologia (17). Também a sua utilização em LIR do transplante de órgãos pode vir a ser uma direcção futura.

Ficam em aberto futuros rumos para ensaios clínicos em genómica mais abrangente (18), ou particularizada a certos diagnósticos como a doença viral C e à expressão de um gene específico como a interleucina 28B (19), ou noutras áreas muito promissoras, para além da genómica, como a determinação de metabolitos no sangue periférico (20). Esta área, denominada genericamente como metabolómica (21), poderá ser um caminho a seguir no sentido da precisão em Transplantação, reproduzindo o conceito abrangente de novo paradigma, descrito primeiramente em cirurgia hepática (22).

## Referências

1. Suhr OB, Ericzon BG, Friman S. Long-term follow-up of survival of liver transplant recipients with familial amyloid polyneuropathy (Portuguese type). *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2002;8(9):787-94.
2. Sharma P, Perri RE, Sirven JE, Zeldenrust SR, Brandhagen DJ, Rosen CB, et al. Outcome of liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2003;9(12):1273-80.
3. Tashima K, Ando Y, Terazaki H, Yoshimatsu S, Suhr OB, Obayashi K, et al. Outcome of liver transplantation for transthyretin amyloidosis: follow-up of Japanese familial amyloidotic polyneuropathy patients. *Journal of the neurological sciences*. 1999;171(1):19-23.
4. Coelho T, Maia LF, da Silva AM, Cruz MW, Plante-Bordeneuve V, Suhr OB, et al. Long-term effects of tafamidis for the treatment of transthyretin familial amyloid polyneuropathy. *Journal of neurology*. 2013;260(11):2802-14.
5. Barroso E. Transplante hepático sequencial com preservação da veia cava inferior (técnica de duplo piggyback). Tese de Doutorado. 2012;Lisboa.
6. Bispo M, Marcelino P, Freire A, Martins A, Mourao L, Barroso E. High incidence of thrombotic complications early after liver transplantation for familial amyloidotic polyneuropathy. *Transplant international : official journal of the European Society for Organ Transplantation*. 2009;22(2):165-71.
7. Bispo M, Marcelino P, Marques HP, Martins A, Perdigoto R, Aguiar MJ, et al. Domino versus deceased donor liver transplantation: association with early graft function and perioperative bleeding. *Liver transplantation : official publication of the American Association for the Study of Liver Diseases and the International Liver Transplantation Society*. 2011;17(3):270-8.
8. Kitchens WH. Domino liver transplantation: indications, techniques, and outcomes. *Transplantation reviews*. 2011;25(4):167-77.
9. Adams D, Lacroix C, Antonini T, Lozeron P, Denier C, Kreib AM, et al. Symptomatic and proven de novo amyloid polyneuropathy in familial amyloid polyneuropathy domino liver recipients. *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis*. 2011;18 Suppl 1:174-7.
10. Kaizu T, Ikeda A, Nakao A, Takahashi Y, Tsung A, Kohmoto J, et al. Donor graft adenoviral iNOS gene transfer ameliorates rat liver transplant preservation injury and improves survival. *Hepatology*. 2006;43(3):464-73.
11. Ben-Ari Z, Issan Y, Katz Y, Sultan M, Safran M, Michal LS, et al. Induction of heme oxygenase-1 protects mouse liver from apoptotic ischemia/reperfusion injury. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2013;18(5):547-55.
12. Farrell GC, Teoh NC, McCuskey RS. Hepatic microcirculation in fatty liver disease. *Anatomical record*. 2008;291(6):684-92.

13. Cameron AM, Ghobrial RM, Yersiz H, Farmer DG, Lipshutz GS, Gordon SA, et al. Optimal utilization of donor grafts with extended criteria: a single-center experience in over 1000 liver transplants. *Annals of surgery*. 2006;243(6):748-53; discussion 53-5.
14. Dinarello CA. Blocking interleukin-1beta in acute and chronic autoinflammatory diseases. *Journal of internal medicine*. 2011;269(1):16-28.
15. Wanderer AA. Ischemic-reperfusion syndromes: biochemical and immunologic rationale for IL-1 targeted therapy. *Clinical immunology*. 2008;128(2):127-32.
16. Dinarello CA, Simon A, van der Meer JW. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nature reviews Drug discovery*. 2012;11(8):633-52.
17. Geiler J, McDermott MF. Gevokizumab, an anti-IL-1beta mAb for the potential treatment of type 1 and 2 diabetes, rheumatoid arthritis and cardiovascular disease. *Current opinion in molecular therapeutics*. 2010;12(6):755-69.
18. Hashmi SK, Baranov E, Gonzalez A, Olthoff K, Shaked A. Genomics of liver transplant injury and regeneration. *Transplantation reviews*. 2014:DOI 10.1016/j.trre.2014.01.002.
19. Firpi RJ, Dong H, Clark VC, Soldevila-Pico C, Morelli G, Cabrera R, et al. CC genotype donors for the interleukin-28B single nucleotide polymorphism are associated with better outcomes in hepatitis C after liver transplant. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2013;33(1):72-8.
20. Goldsmith P, Fenton H, Morris-Stiff G, Ahmad N, Fisher J, Prasad KR. Metabonomics: a useful tool for the future surgeon. *The Journal of surgical research*. 2010;160(1):122-32.
21. Wishart DS. Metabolomics: the principles and potential applications to transplantation. *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2005;5(12):2814-20.
22. Dong J, Yang S, Zeng J, Cai S, Ji W, Duan W, et al. Precision in liver surgery. *Seminars in liver disease*. 2013;33(3):189-203.





## RESUMO

O transplante hepático ortotópico é uma terapêutica aceite para casos seleccionados de falência hepática terminal. O procedimento tem-se aperfeiçoado, evidenciado pelo aumento da taxa de sobrevida de 30 para 75% aos 5 anos, mas cerca de 13 a 27% dos enxertos desenvolve falência primária (PNF) ou disfunção primária (DF) após o transplante. As consequências são devastadoras para a sobrevida do doente e do enxerto. A sua etiologia é multifactorial, incluindo factores relacionados com o dador e o receptor, tempos de isquémia, agressões cirúrgicas, bem como características anatomopatológicas do enxerto.

A lesão de isquémia/reperfusão mantém-se como um factor de risco intra operatório, com implicações directas sobre toda a evolução do transplante: existe uma relação íntima entre a PNF e a DF, a preservação do enxerto, a lesão de isquémia/reperfusão, e a falência do transplante. Além disso, está comprovada evidência que sugere que a lesão de I/R torna um aloenxerto mais vulnerável por aumento da imunogenicidade, aumentando a probabilidade de episódios de rejeição precoce e tardia.

Com base na prática clínica quotidiana do CHBPT / HCC, estudaram-se 54 casos de transplante hepático, agrupados segundo grupos por alocação do enxerto respectivo: Grupo 1 (n=27): dador cadáver para receptor cirrótico, Grupo 2 (n=15): dador cadáver para receptor PAF, Grupo 3 (n=12): dador PAF para receptor cirrótico.

Observaram-se as alterações histológicas e moleculares sobre o enxerto até ao final da operação do receptor, e as suas consequências clínicas, avaliando:

- As diferentes capacidades de resistência de cada enxerto à lesão de isquémia/reperfusão.
- As situações em que os factores do receptor se sobrepõem às do enxerto na definição do prognóstico, e vice versa.

- A relevância das lesões histológicas e moleculares precoces no tecido hepático na evolução do enxerto e do receptor

Foram colhidas biópsias por agulha dos 54 enxertos hepáticos, 42 provenientes de cadáver com coração batente (morte cerebral) e 12 provenientes de dador vivo com PAF, em três tempos diferentes do processo de colheita e transplante hepático:

- A primeira (T0) antes da clampagem da aorta do dador
- A segunda (T1) no final da isquémia fria
- A terceira (T2) após a reperfusão do enxerto, durante o encerramento da parede abdominal.

A estas amostras foi extraído RNA total, convertido em cDNA por transcrição reversa e feita a análise da expressão dos genes da CTLA4, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$ , Perforina, Selectina E (SELE), Fas-ligando, Granzima-B, Heme-Oxigenase 1 (HO1) e Óxido Nítrico Sintetase (iNOS2A) por PCR quantitativo segundo o método do Ct comparativo, utilizando como referência a expressão dos genes da amostra não-isquémica – T0. Os fragmentos de todas as biópsias foram seccionados, para envio de amostra comparativa para processamento histológico habitual, sem qualquer alteração ao protocolo seguido habitualmente na Unidade de Transplantação do Hospital Curry Cabral.

A presença de alguns parâmetros histológicos definidos, como esteatose, necrose, vacuolização, congestão sinusoidal e infiltração neutrofílica, foi registada e contabilizada numa classificação numérica.

O seguimento clínico e laboratorial, bem como o acompanhamento de eventuais complicações, foi registado e correlacionado com os dados das colheitas de órgãos e com os dados das biópsias.

Foram consideradas as seguintes variáveis, como as mais relevantes e objectivas para a interpretação da evolução clínica, tendo sido comparadas estatisticamente com os dados recolhidos, laboratoriais e clínicos: disfunção do enxerto,

complicações pós operatórias, número de reinternamentos igual ou superior a 2 e rejeição crónica e/ou morte do receptor.

Foram identificadas características clínicas menos favoráveis, a considerar, nalgumas circunstâncias: género feminino do receptor (sobretudo associado a enxerto masculino,  $p=0,077$ ), isquémia fria superior a 500 minutos ( $p=0,074$ ), isquémia quente superior a 90 minutos ( $p=0,099$ ).

Na análise laboratorial, distinguiram-se duas características histológicas desfavoráveis e irreversíveis, como índice de mau prognóstico: a necrose e a balonização ( $p=0,029$ ); no painel genético escolhido neste estudo, a expressão basal de IL-1 $\beta$  ( $p=0,028$ ), de SELE ( $p=0,013$ ) e de FAS-L ( $p=0,079$ ) relacionaram-se com pior prognóstico.

Algumas características protectoras intrínsecas dos enxertos só se revelaram indirectamente, como menor infiltração neutrofílica e maior expressão de HO1 e de iNOS nos enxertos PAF, não tendo sido possível provar uma interferência directa nos resultados clínicos. Não se obteve expressão mensurável de genes anti-inflamatórios nas biopsias hepáticas processadas neste estudo, como a IL13 e a IL4: assim, com a metodologia utilizada, não foi possível obter um perfil de expressão genética associado a boa evolução clínica. O perfil inverso foi sugerido apenas pela expressão basal dos 3 genes mencionados (**FAS-L, IL-1 $\beta$  e SELE**) no mesmo painel, com o protocolo seguido neste conjunto de 54 doentes.

As características do receptor sobrepuseram-se às do enxerto no caso de:

- diagnóstico de **PAF no receptor**, que determinou uma maior predisposição para a disfunção do enxerto, o que, por sua vez, determina uma menor sobrevida. No entanto, o diagnóstico de PAF no receptor exhibe uma curva de sobrevida mais favorável.
- receptores com um baixo balanço de risco (BAR) definiram características favoráveis para enxertos com níveis baixos e moderados de **esteatose**, fazendo que esta característica, definida como um risco acrescido, não só não se manifestasse clinicamente, como parecesse um factor favorável.

As características do enxerto sobrepuseram-se às do receptor no caso de:

- tempo de isquemia fria superior a 500 minutos
- balonização, necrose, FAS-L, IL-1 $\beta$  e SELE em T0

A integração dos resultados moleculares e morfológicos com a evolução clínica, realça o papel da mobilização precoce de neutrófilos nos desempenhos menos favoráveis do enxerto hepático.

## SUMMARY

Orthotopic liver transplantation is an accepted therapeutic procedure for selected cases of terminal liver failure. The procedure has been improved, evidenced by the rise of survival rates from 30 to 70% at 5 years, but 13 to 27% of the liver grafts develop primary non function (PNF) or primary dysfunction (PDF) after transplantation. The consequences are devastating for the survival of the patient and of the graft. Its etiology is multifactorial, including factors related with the donor and with the recipient, ischemic times, surgical aggressions, as well as the histological characteristics of the graft.

The ischemia/reperfusion lesion is still an intra operative risk factor, with direct implications in the whole transplant outcome: there is a close interrelation between PNF and DF, graft preservation, ischemia / reperfusion lesion and graft failure. Beyond this, there is proved evidence that suggests that I/R lesion turns the allograft more vulnerable by increasing its immunogenicity, increasing the probability of precocious and late rejection episodes.

Based on the daily clinical practice at CHBPT / HCC, 54 cases of hepatic transplantation have been studied, grouped by allocation of each graft: Group 1 (n=27): deceased donor to cirrhotic recipient, Group 2 (n=15): deceased donor to FAP recipient, Group 3 (n=12): FAP living donor to cirrhotic recipient.

The histologic and molecular changes in the liver graft were observed until the end of the recipient operation, together with its clinical consequences, evaluating:

- The different capacity of resistance of each graft to the ischemia / reperfusion lesion
- The situations where the recipient factors overlap the ones of the graft, in the definition of prognosis, and vice versa.
- The relevance of the precocious histologic and molecular lesions of the hepatic tissue in the clinical outcome of the graft and the recipient.

Needle biopsies were obtained from 54 liver grafts, 42 deceased brain dead donors and 12 from FAP living donors, at three different times of the harvesting and the hepatic transplantation:

- The first one (T0) before clamping the donor aorta
- The second one (T2) in the end of cold ischemia time
- The third one (T) after the reperfusion of the graft, during the closure of the abdominal wall.

Total RNA was extracted to these samples, converted to cDNA by reverse transcription and the analysis of gene expression was made for CTLA4, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-13, TNF- $\alpha$ , Perforin, E Selectin (SELE), Fas-ligand, Granzyme-B, Heme-Oxygenase 1 (HO1) and Nitric Oxide Synthetase (iNOS2A) by quantitative PCR, according with the Ct comparative method, using the expression of the non ischemic sample – T0. The fragments of all the biopsies were divided, to send a comparative sample to the usual histologic processement, keeping the same usual protocol at the Transplantation Unit of Curry Cabral Hospital.

The presence of some defined histologic parameters, such as steatosis, necrosis, vacuolization, sinusoidal congestion and neutrophilic infiltration, was registered and catalogued in a numeric classification.

The clinical and laboratory follow-up, as well as the following of eventual complications, was registered and correlated with the data from organ procurement operations and with the data from the biopsies.

The following variables were considered as the most relevant and objective ones, to the interpretation of the clinical evolution, being statistically compared with the clinical and laboratorial collected data: graft dysfunction, post-operative complications, number of readmissions of 2 or more and chronic rejection and / or recipient death.

There were identified some unfavorable clinical characteristics, to be considered under certain circumstances: recipient female gender (specially associated with male

graft,  $p=0,077$ ), cold ischemia time of more than 500 minutes ( $p=0,074$ ), warm ischemia time of more than 90 minutes ( $p=0,099$ ).

In the laboratory analysis, two histologic characteristics were identified as unfavorable and irreversible, associated with bad prognosis: necrosis and balonization ( $p=0,029$ ); in the gene panel selected in this study, the basal expression of IL-1 $\beta$  ( $p=0,028$ ), SELE ( $p=0,013$ ) and FAS-L ( $p=0,079$ ) were related with worse prognosis.

Some intrinsic protective characteristics of the grafts were only indirectly revealed, such as less neutrophilic infiltration and bigger expression of HO1 and iNOS in FAP grafts, being impossible to prove any direct interference in the clinical results. A relevant and measurable expression of the anti inflammatory genes IL13 and IL4 was not obtained: with the used methodology, it was impossible to obtain a gene expression profile associated with a favorable clinical outcome. The inverse profile was suggested only by the basal expression of the three mentioned genes (FAS-L, IL-1 $\beta$  e SELE) in the same gene panel, according with the followed protocol in this group of 54 patients.

The characteristics of the recipient overlapped those from the graft, in the case of :

- FAP diagnosis in the recipient, which determined a bigger predisposition to graft dysfunction, which by itself determines a shorter survival. However, FAP diagnosis in the recipient depicts a more favorable survival curve.
- Recipients with a low balance risk index (BAR) defined favorable characteristics to grafts with low and moderate grades of steatosis, making that this characteristic, associated with bad prognosis, looked like a favorable factor, and with no clinical interference.

The graft characteristics overlapped those from the receptor in the case of:

- Cold ischemic time more than 500 minutes
- Balonization, necrosis, FAS-L, IL-1 $\beta$  and SELE at T0

The integration of molecular and morphologic results with the clinical evolution, stresses the role of a precocious neutrophils mobilization in the worse outcomes of liver grafts.



## Agradecimentos

Na elaboração deste trabalho, tive o contributo de vários profissionais, que não só elaboraram e reviram as suas respectivas áreas, como, acima de tudo, me ensinaram noções fundamentais descritas nos vários capítulos, e a quem exprimo a minha mais profunda gratidão.

Na área da expressão genética e Biologia Molecular, o contributo dos Drs. Dário Ligeiro, João Sobral, da Dra. Olga Abade e do Prof. Hélder Trindade, do Centro de Histocompatibilidade da zona Sul – Lusotransplante, foi inexcedível: toda a árdua tarefa, desde a escolha do painel genético aos resultados finais da sua expressão a eles se deve. Agradeço-lhes ainda, todos os ensinamentos e comentários.

O tratamento estatístico dos dados obtidos foi efectuado pela Dra. Marta Alves e Prof<sup>a</sup> Ana Luísa Papoila, da Faculdade de Ciências Médicas: o meu profundo reconhecimento.

Todos os meus colegas de Serviço participaram na longa recolha e transporte das amostras biológicas, a quem colectivamente agradeço, destacando, pela sua disponibilidade constante, participação e apresentação dos resultados preliminares, o meu amigo e colega Emanuel Vigia.

Aos elementos do Centro de Colheita do Centro Hospitalar de Lisboa Central agradeço a disponibilização dos dados referentes à doação, bem como o transporte das biopsias efectuadas nas colheitas.

Os dados anatomopatológicos foram integralmente processados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Curry Cabral, a quem agradeço colectivamente na pessoa do seu Director, o Dr. António Lázaro; destaco e agradeço profundamente à Dra. Ana Carvalho, pelo magnífico e exaustivo trabalho de leitura e classificação numérica de quase 200 biopsias hepáticas, e pelos constantes ensinamentos e esclarecimentos.

Aos enfermeiros do CHBPT-HCC agradeço a colaboração no processamento e transporte das biopsias, bem como muita da informação clínica, tanto no Bloco Operatório, como na enfermaria e na Consulta Externa.

Ao Prof. Dr. António Pedro Alves de Matos agradeço todo o processamento e interpretação das biopsias lidas por microscopia electrónica.

Aos meus colegas de Serviço, o meu reconhecimento por todo o apoio dado nas várias etapas da elaboração deste trabalho, nomeadamente ao Dr. Américo Martins. E sobretudo aos meus colaboradores directos, por me terem proporcionado o tempo suficiente, ao me terem substituído no trabalho clínico, Drs. Edite Filipe, Ana Marta Nobre, Luís Bicho e Emanuel Vigia, o meu reconhecimento. Também um agradecimento especial aos meus colegas João Santos Coelho e Hugo Pinto Marques, por todo o apoio e pela grande parte do trabalho clínico aqui discutido.

Ao Prof. Dr. Rui Perdigoto, à Dra. Ana Morbey e ao Dr. Luís Botelho, agradeço a colaboração na recolha de dados clínicos, bem como os muitos comentários e a revisão do trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Marcelino fico a dever a revisão de todos os capítulos, a concepção da estrutura final do documento e o contributo decisivo na elaboração dos resumos e trabalhos científicos que foram a génese dos artigos publicados: o meu maior reconhecimento.

Ao Prof. Dr. Fernando Nolasco, a minha gratidão pela aceitação em ser meu coorientador de tese, pela revisão do trabalho e apoio em todo o processo, desde o seu início.

Ao meu antigo Director de Serviço, Dr. João Rodrigues Pena, que me introduziu na Transplantação e a quem muito devo como cirurgião, os meus agradecimentos pela revisão do documento e todas as correcções.

Ao Prof. Dr. José Fragata, meu orientador de tese, por todas as provas de apoio, orientação, correcções e constantes ensinamentos, que levaram à sua elaboração e

posterior conclusão, sempre com um incentivo decisivo e que não esqueço: o meu muito obrigado.

Ao meu Director de Serviço, Prof. Dr. Eduardo Barroso, a quem devo toda a formação em cirurgia hepatobiliopancreática e a grande parte da formação em Transplantação, agradeço o facto de poder estar hoje a finalizar esta tese, que não seria concluída sem o seu apoio a todos os níveis, incluindo a disponibilização de verbas para material da parte experimental. A minha gratidão, também, por me ter concedido o tempo suficiente para a sua elaboração e pela revisão final.

Finalmente, não posso deixar de mencionar o contributo especial da minha Mãe, que me ajudou na revisão deste trabalho escrito em língua Portuguesa com um perfeccionismo que sempre a caracterizou, e o estímulo e apoio incondicional da Graça que, para além do auxílio precioso na elaboração do manuscrito final, contribuiu de forma decisiva para a concretização deste trabalho.